

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Mestrado Integrado em Medicina

**Como células de cancro da mama modificam
a angiogénese tumoral: “educação” de células
endoteliais por exosomas**

Trabalho Final de Mestrado

Aluna: Margarida Amorim de Magalhães, n.º 12745

Orientador: Dr. Sérgio Dias

Oncologia Médica

Ano letivo 2015/2016

RESUMO

É conhecida a associação entre o crescimento de tumores sólidos e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Células tumorais produzem fatores pro-angiogênicos, tais como o VEGF, os quais estimulam a angiogênese.

Demonstrou-se haver sobreexpressão de VEGF em vários câncros, pelo que este pode constituir um alvo terapêutico. Têm sido desenvolvido agentes no sentido de bloquear o VEGF ou o seu sistema de sinalização, no entanto, de um modo geral, estes têm demonstrado eficácia clínica limitada e vários efeitos adversos. Pensa-se, assim, que a falta de eficácia dos agentes anti-VEGF pode advir da existência de vias de sinalização independentes de VEGF.

Os exosomas representam uma via importante de comunicação intercelular, servindo como veículos de transporte de proteínas, lípidos, mRNAs e microRNAs até células-alvo, modificando as suas propriedades. Sabe-se que células tumorais libertam elevadas quantidades de exosomas, no entanto o modo como estes modificam o microambiente tumoral ainda não é completamente conhecido.

Neste projeto, colocamos como hipótese que exosomas libertados por células tumorais poderão constituir um mecanismo que induz angiogênese de forma independente de VEGF. Demonstrámos que células tumorais mamárias MDA-MB-231 libertam exosomas que modulam a morfogênese endotelial, o que sugere que estes poderão constituir um potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: angiogênese, cancro, exosomas, VEGF.

ABSTRACT

The association between the growth of solid tumors and new blood vessels formation (angiogenesis) is known. Tumor cells release pro-angiogenic factors, such as VEGF, which stimulate blood vessels formation.

VEGF overexpression is detected in many cancers, so it could represent a therapeutic target. Agents aimed at blocking VEGF or its receptor-signalling system are currently being developed. In general, they have shown limited clinical effectiveness and serious side effects. It is believed that the lack of effectiveness of anti-VEGF therapies may be related to VEGF-independent pathways.

Exosomes represent an important way of intercellular communication. They serve as delivery carriers of proteins, lipids, mRNAs and microRNAs to a target cell, modifying its properties. It is known that tumor cells release a large amount of exosomes, however the way they modify the tumor microenvironment is still not well understood.

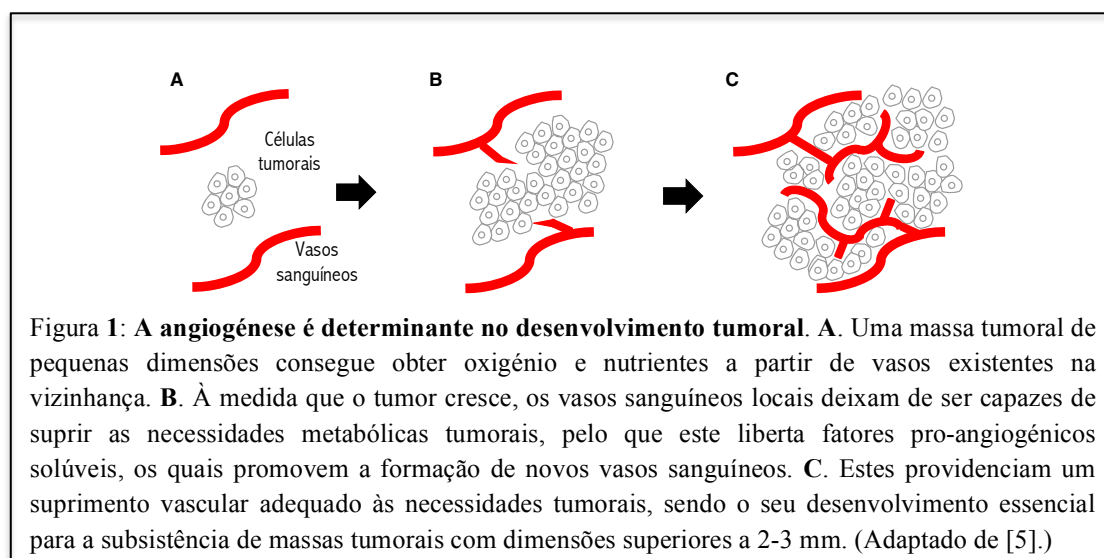
In our project, we hypothesize that exosomes released by tumour cells may be a mechanism that induces angiogenesis in a VEGF-independent way. We showed that breast cancer cells MDA-MB-231 release exosomes that modulate endothelial morphogenesis. These results suggest that exosomes may be a therapeutic target.

Key words: angiogenesis, cancer, exosomes, VEGF.

INTRODUÇÃO

Com base em estudos que demonstraram uma associação entre o crescimento de tumores sólidos e a formação de um sistema vascular próprio, J. Folkman e colaboradores postularam, em 1971, que o desenvolvimento de uma massa tumoral é acompanhado e dependente de um processo de neovascularização, denominado angiogénese [1]. O processo de angiogénese assume particular relevância no desenvolvimento embrionário e fetal sendo que, em condições fisiológicas, no adulto, está restrito aos processos de cicatrização de feridas, manutenção do sistema vascular e ciclo menstrual [2].

Enquanto massas tumorais de pequenas dimensões (nomeadamente com diâmetro inferior a 2-3 mm), têm a capacidade de adquirir, por intermédio de processos de difusão, oxigénio e nutrientes necessários aos seus processos celulares, a partir de vasos sanguíneos existentes na vizinhança, tumores de dimensões superiores requerem um suporte vascular próprio [1,2]. Sendo o desenvolvimento de um sistema vascular um fator limitante do crescimento tumoral, as células tumorais libertam diversos fatores com propriedades pró-angiogénicas [1,2-4]. Assim, células endoteliais, quando estimuladas por células tumorais, transitam de um estadio basal quiescente para um estadio proliferativo, permitindo, deste modo, a formação de novos vasos sanguíneos [3-5]. Sabe-se ainda que percussores de células endoteliais migram, a partir da medula óssea, em resposta à libertação de fatores quimiotáticos por células tumorais. Estes percussores sofrem processos de maturação, originando células endoteliais, as quais permitem a formação de novos vasos sanguíneos [6].



A angiogénese é um processo estritamente regulado por intermédio de diversos fatores de crescimento, nomeadamente o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [2,6]. Sendo este um agente mitogénico específico de células endoteliais e produzido por vários tipos de células, nomeadamente células tumorais [2,4], assume um papel central no processo de angiogénese tumoral [6].

O VEGF compreende uma família de ligandos estruturalmente relacionados entre si: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (*Placental Growth Factor*). Estes interagem com recetores de tirosina cinase, nomeadamente VEGFR1 (expresso predominantemente em monócitos e macrófagos), VEGFR2 (recetor específico de células do endotélio vascular) e VEGFR3 (com expressão predominante em células endoteliais linfáticas, no entanto sabe-se que pode ser expresso, de forma transitória, em células endoteliais em processo de angiogénese ativa) [5,7,8]. O VEGF pode ainda interagir com outros recetores e moléculas acessórias [7], no entanto a interação VEGF-VEGFR2 é a mais importante no que concerne ao processo de angiogénese [4], no qual o VEGF, ao ligar-se a recetores de tirosina cinase expressos à superfície de células endoteliais, promove a sua ativação e subsequente fosforilação de proteínas envolvidas em cascatas de transdução de sinal [2].

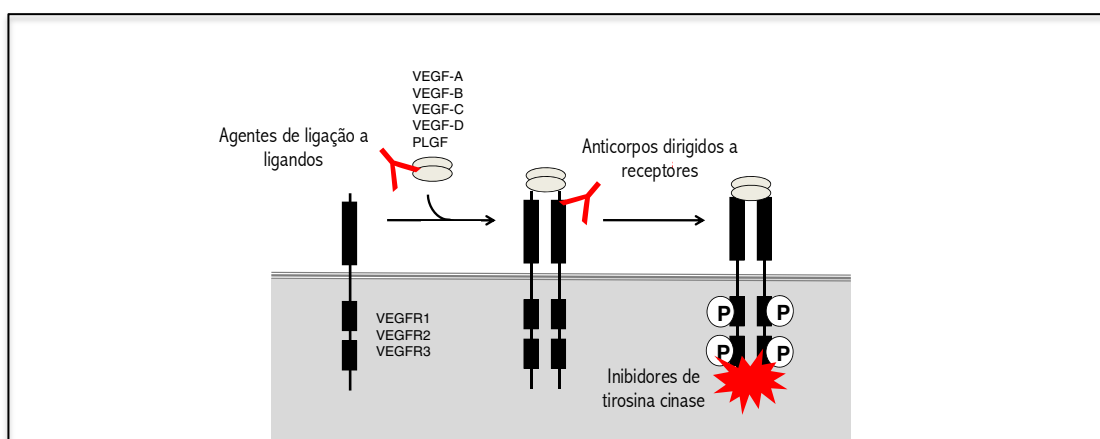


Figura 2: Sinalização VEGF e mecanismos moduladores. O sistema de sinalização VEGF é complexo, consistindo em cinco ligandos relacionados entre si: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF, os quais se ligam com diferente especificidade a três recetores de tirosina cinase: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Na figura estão representadas, de um modo simplificado, as três principais classes de agentes que interagem com este sistema de sinalização celular: (1) agentes que se ligam a ligandos, bloqueando, assim, a ligação do VEGF aos seus recetores; (2) anticorpos que bloqueiam a sinalização via VEGF, interagindo com os VEGFRs; e (3) inibidores de tirosina cinase, os quais bloqueiam a atividade cinase de VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Note-se que os inibidores de tirosina cinase podem também inibir a atividade de tirosina cinase de outros recetores de tirosina cinase, incluindo PDGFRs (*Platet derived growth factor receptors*), c-Kit e FLT3 (*fms-related tyrosine kinase*). (Adaptado de [5].)

O VEGF desempenha um papel central na regulação do processo de angiogénese, dado que serve como ponto de integração de diversos de sinais moleculares que, em última instância, modulam as propriedades da célula endotelial [2,6]. Não obstante, vários estudos demonstraram haver sobreexpressão de VEGF em vários cancros [5], bem como aumento dos níveis de expressão de VEGFR2 em células do endotélio vascular, no decorrer do processo angiogénico [9]. O VEGF estimula a angiogénese atuando diretamente sobre as células endoteliais, entidades geneticamente estáveis, contrariamente às células tumorais, que são geneticamente bastante lábeis [2].

Nas últimas décadas, a possibilidade de modular o processo de angiogénese tumoral tem sido reconhecido como um potencial mecanismo de supressão do crescimento tumoral, tendo o VEGF merecido especial atenção como potencial alvo para o desenvolvimento de terapêuticas anti-angiogénicas [2,6], dado que a sua inibição poderá suprimir o crescimento tumoral, ao diminuir o aporte de oxigénio e nutrientes às células tumorais [2,4,7]. Kim *et al.*, utilizando um anticorpo monoclonal específico do VEGF, foram capazes de suprimir o crescimento de várias linhagens tumorais, em modelos animais, bem como demonstraram haver uma diminuição da densidade de vasos tumorais, decorrente da utilização destes agentes [10].

Nos últimos anos têm sido desenvolvido vários agentes no sentido de bloquear o VEGF ou o sistema de sinalização associado à ativação do seu recetor [2,5]. Não obstante a eficácia na inibição do crescimento tumoral com a utilização de agentes anti-angiogénicos em estudos pré-clínicos, diversos estudos de âmbito clínico têm revelado efeitos relativamente modestos com a utilização destes agentes e, de um modo geral, a sua utilização apenas permite prolongar a sobrevida dos doentes em alguns meses, além de apresentarem efeitos adversos significativos, tais como fenómenos tromboembólicos, hipertensão, toxicidade renal, insuficiência cardíaca congestiva [5,6,10,11]. Sabe-se, atualmente, que a eficácia das terapêuticas anti-angiogénicas difere consoante os vários tipos de cancro [6]; de um modo geral, estas têm demonstrado maior eficácia em cancros muito vascularizados, nomeadamente no carcinoma de células renais associado a inativação do gene Von Hippel-Lindau, o que se traduz na expressão de níveis elevados de VEGF, no qual o tratamento com Bevacuzimab (anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF) tem apresentado resultados positivos [5,6,12,13], ao contrário de cancros pouco vascularizadas, tais

como o adenocarcinoma do pâncreas e cancro gástrico, nos quais a administração destes agentes se tem revelado pouco efetiva [6,14,15]. A expressão de níveis elevados de fatores pro-angiogénicos tem sido associada a um pior prognóstico em vários tipos de cancros, incluindo cancro da mama [16].

| Agente | Mecanismo de ação |
|-------------|---|
| Bevacizumab | Anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF |
| Aflibercept | Inibe VEGFR1 e VEGFR2 |
| Sorafenib | Inibe VEGFRs, PDGFRs, FLT3, RAF-1, BRAF |
| Sunitinib | Inibe VEGFRs, FLT3, c-kit, PDGFRs |
| Pazopanib | Inibe VEGFRs, PDGFRs, FGFR1, FGFR3, c-kit |
| Axitinib | Inibe VEGFR1-3 |
| Vandetanib | Inibe VEGFRs, RET, EGFRs |
| Regorafenib | Inibe VEGFRs, RET, c-kit, PDGFRs, FGFR1-2 |
| Lenvantinib | Inibe VEGFRs, RET, FGFR |

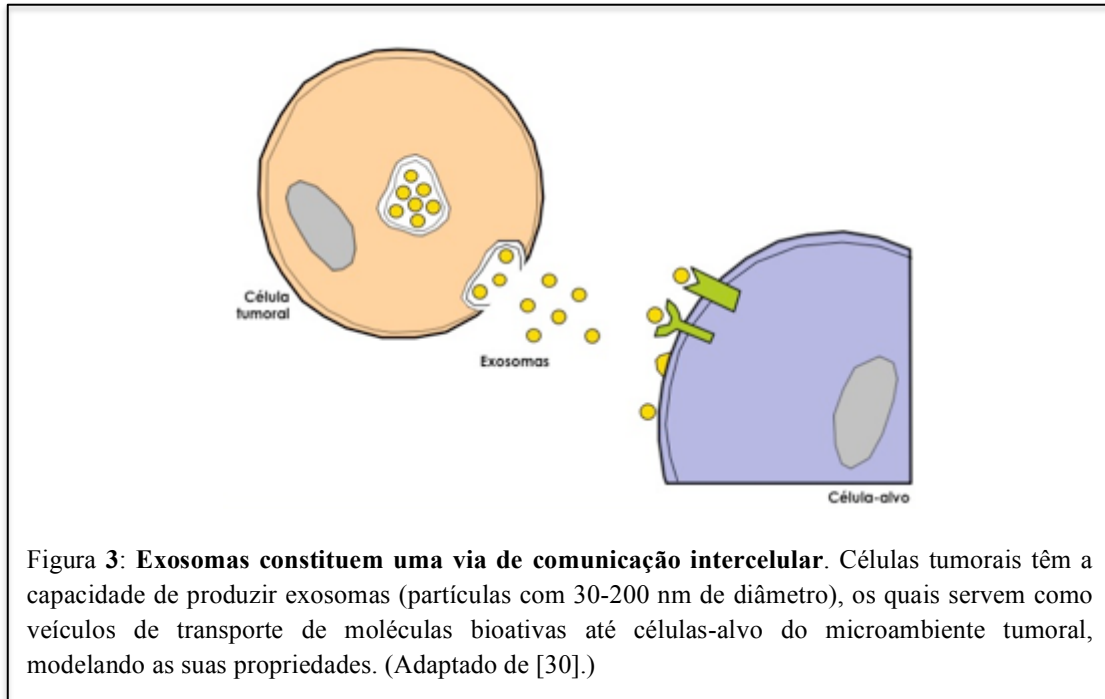
Tabela 1: Principais agentes terapêuticos anti-VEGF atualmente utilizados. [17]

O facto de o VEGF constituir um elemento central na regulação do processo de angiogénese e a utilização de agentes terapêuticos no sentido de inibir esta via de sinalização não ter alcançado os resultados espectáveis, isto sugere a existência de vias de sinalização independentes de VEGF, as quais poderão permitir o desenvolvimento de uma massa tumoral, em caso de bloqueio da sinalização associada ao VEGF [5,18]. Admite-se que a eficácia das terapêuticas anti-angiogénicas possa ser influenciada pelo estadio tumoral [5], dado que, por exemplo, biópsias de cancro da mama revelaram que, enquanto tumores em estadios iniciais expressam preferencialmente VEGF, tumores em estadios mais avançados têm a capacidade de expressar outras citocinas, as quais apresentam potencial angiogénico [19]. Outra hipótese que se coloca é que a falta de eficácia destes agentes possa estar relacionada com as características do próprio nicho tumoral [3,5,7], assim como que, ao longo do desenvolvimento tumoral, as células podem tornar-se autónomas face a estimulação via VEGF [4,6]. A utilização de terapêuticas anti-angiogénicas por longos períodos de tempo pode ser necessária para suprimir o crescimento tumoral porém admite-se, atualmente, que a inibição prolongada da via de sinalização

associada ao VEGF, ao diminuir o sistema vascular tumoral, induz hipóxia tecidual, o que poderá servir como estímulo à secreção de citocinas “compensatórias”, tais como o FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*), SDF-1 α (*Stromal Cell-derived Factor 1*), permitindo, assim, a sobrevivência e crescimento tumoral [7,11,21]. Neste contexto, admite-se que uma inibição eficiente e prolongada da angiogénese e, conseqüentemente, do crescimento tumoral poderá assentar no desenvolvimento de protocolos terapêuticos incluindo agentes capazes de interagir com múltiplas vias de sinalização envolvidas no processo de angiogénese [2,5].

O processo de comunicação entre as células tumorais e o microambiente envolvente assume um aspeto fulcral no que concerne ao desenvolvimento e progressão tumoral [16,22]. De facto, nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que as células tumorais têm a capacidade de produzir diversos fatores que atuam sobre o microambiente, modificando as suas propriedades, de modo a obter condições favoráveis ao desenvolvimento tumoral [22,23].

Recentemente, micropartículas celulares, nomeadamente exosomas (30-200 nm de diâmetro) e micro-vesículas (200-1000 nm de diâmetro) têm sido reconhecidos como um importante meio de comunicação intercelular, quer localmente, quer à distância [22,24-26]. Estes, ao servirem como veículos de transporte de moléculas bioativas tais como proteínas, lípidos, mRNAs e microRNAs, permitem a transferência horizontal de elementos celulares que, atuando em células-alvo, se sabe terem a capacidade de modelar as suas propriedades [22,23,27]. Demonstrou-se que células tumorais libertam, comparativamente a outras células, elevadas quantidades de exosomas, os quais se pensa poderem estar envolvidos na transferência de moléculas até células-alvo [29] e, eventualmente, desempenharem papéis importantes no desenvolvimento tumoral [22,25,27]. Neste contexto reconhece-se, atualmente, que o processo de angiogénese é passível de ser modulado não apenas por intermédio de fatores solúveis, mas também por exosomas e microvesículas libertados por células tumorais [20,27].



O mecanismo subjacente ao processo de “educação” de células endoteliais por parte de células tumorais, modificando as suas propriedades e, eventualmente, a sua dependência face a sinais pró-angiogénicos como o VEGF, envolve mecanismos ainda desconhecidos, os quais poderão justificar a falta de resposta a terapêuticas anti-angiogénicas. Este trabalho centra-se no estudo de mecanismos de comunicação intercelular, nomeadamente no que diz respeito à libertação de exosomas por parte de células tumorais e de que modo estes poderão influenciar o processo de angiogénese tumoral. De facto, a compreensão dos mecanismos de comunicação celular é fundamental para se perceber a biologia do desenvolvimento tumoral, assim como para o desenvolvimento de novas terapêuticas. São objetivos deste trabalho o isolamento de exosomas libertados por células tumorais mamárias, no sentido de averiguar se estes estão implicados na modulação do potencial angiogénico de células endoteliais, bem como investigar se os exosomas constituem uma via de indução de angiogénese alternativa à sinalização via VEGF.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Células endoteliais da microvasculatura dérmica (HMVEC) e células tumorais MDA-MB-231 (representativas de adenocarcinoma mamário humano), foram plaqueadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, da Gibco) suplementado com estreptomicina e 10% FBS (*Fetal bovine serum*) e incubadas a 37°C, durante 48 horas. Após este período, procedeu-se à recolha das células, as quais foram sujeitas a um processo de centrifugação e, posteriormente, plaqueadas em número pré-determinado.

Isolamento de exosomas

Para proceder ao isolamento de exosomas tumorais, células tumorais mamárias MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com estreptomicina e 10% de FBS desprovido de exosomas (previamente removidos por ultracentrifugação). No sentido de permitir a libertação de exosomas por parte das células tumorais, células tumorais mamárias MDA-MB-231 foram mantidas em cultura a 37°C, durante 48 horas, após as quais o meio que esteve em contacto com as células (meio condicionado) foi recolhido. Este foi então sujeito a centrifugações a baixa velocidade, seguindo-se a realização de sucessivas centrifugações (300 x g, durante 10 minutos; 2000 x g, durante 10 minutos; 10000 x g, durante 30 minutos). Finalmente, procedeu-se ao isolamento de exosomas por precipitação através de ultracentrifugação a 100000 x g, durante 70 minutos.

Microscopia electrónica

Frações de exosomas isolados aplicando o protocolo anteriormente descrito foram fixados em formaldeído e, posteriormente, observadas e documentadas através de microscopia electrónica.

Morfogénese endotelial

Um determinado número de células endoteliais da microvasculatura dérmica foi plaqueado em placas de 24 poços, em *Growth Factor Reduced Matrigel*, o qual consiste num meio semi-sólido que permite visualizar estruturas de modo

tridimensional. As células permaneceram em cultura a 37°C, durante um período de 24 horas. Procedeu-se, então, à observação através do microscópio óptico invertido e captura de imagens, utilizando uma ampliação de 20x.

Análise estatística

Todos os procedimentos previamente descritos foram realizados em triplicado. A significância foi avaliada através do test T de Student, sendo que valor $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Nos gráficos apresentados está representado o desvio padrão.

RESULTADOS

Meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 estimula a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica

No sentido de averiguar se células tumorais têm a capacidade de modular o comportamento de células endoteliais, realizamos ensaios de proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica. Assim, o mesmo número de células endoteliais foi colocado a crescer em duas condições distintas: em meio DMEM suplementado com 10% FBS (condição controlo) e em meio que tinha estado em contacto com células tumorais mamárias MDA-MB-231 (meio condicionado). Após 24 horas em cultura, fomos averiguar se havia diferenças a nível da proliferação celular entre as referidas condições. Avaliou-se, então, o número de células em cada uma das condições utilizando um hemocítmetro, sendo a viabilidade das células determinada por exclusão com utilização de *Trypan blue*. Tal como se pode constatar no gráfico apresentado em baixo, constatou-se que células endoteliais da microvasculatura dérmica apresentavam uma maior proliferação quando cultivadas em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231, comparativamente a quando cultivadas em meio próprio, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

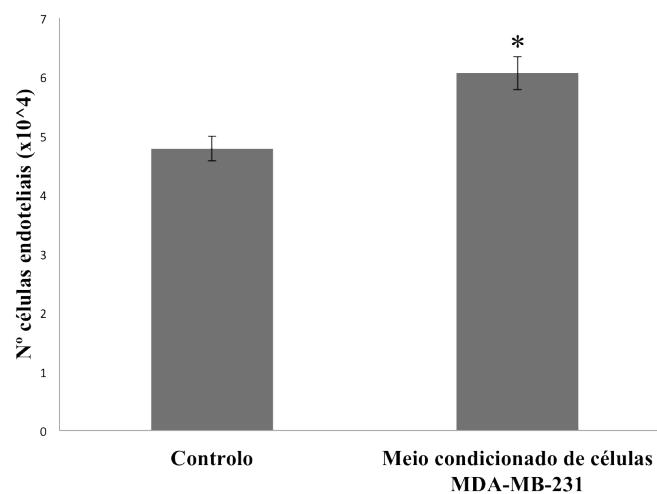
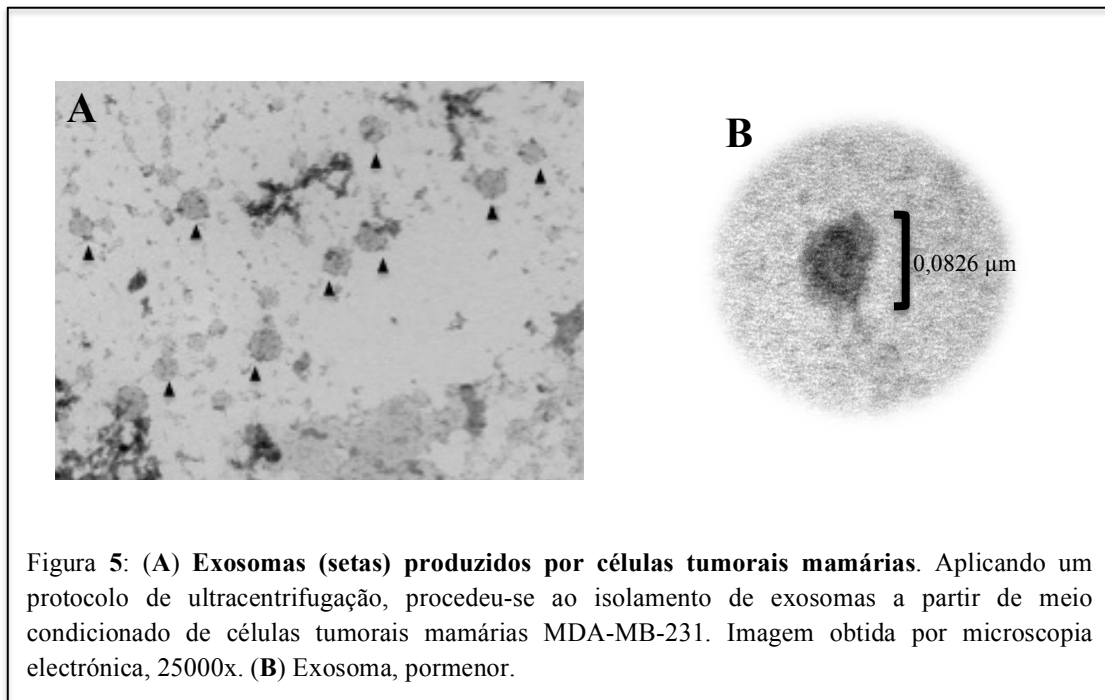


Figura 4: **Meio condicionado de células tumorais mamárias induz a proliferação de células endoteliais.** O mesmo número de células endoteliais da microvasculatura dérmica foi cultivado em meio próprio ou em meio condicionado de tumorais mamárias MDA-MB-231. Após 24 horas, o número de células presentes em cada uma das condições foi avaliado. A figura representa as médias +/- os desvios padrões de uma experiência realizado em triplicado (* $p < 0.05$).

Células tumorais mamárias MDA-MB-231 libertam exosomas, os quais estimulam a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica

Tendo-se constatado que meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 exerce um efeito estimulador sobre a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica, realizámos um protocolo com vista ao isolamento de exosomas libertados por células tumorais. Através de técnicas de microscopia electrónica, constatámos a presença de micropartículas nesse meio, cujas características são compatíveis com exosomas.



Tendo-se demonstrado a presença de micropartículas compatíveis com exosomas no meio que esteve em contacto com células tumorais mamárias MDA-MB-231, foi-se averiguar se estas tinham a capacidade de modular a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica. Assim, o mesmo número de células endoteliais foi colocado a crescer em duas condições distintas: em meio DMEM suplementado com 10% FBS desprovido de exosomas (condição controlo) e em meio condicionado enriquecido com exosomas libertados por células tumorais mamárias MDA-MB-231. Após 24 horas, procedeu-se à contagem do número de células endoteliais em cada uma das condições, utilizando para isso um hemocítmetro e a viabilidade das células determinada por exclusão com utilização de *Trypan blue*. Tal como se pode constatar no gráfico seguinte, constatou-se a existência de uma relação entre a quantidade de exosomas presentes no meio e o índice de proliferação celular, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

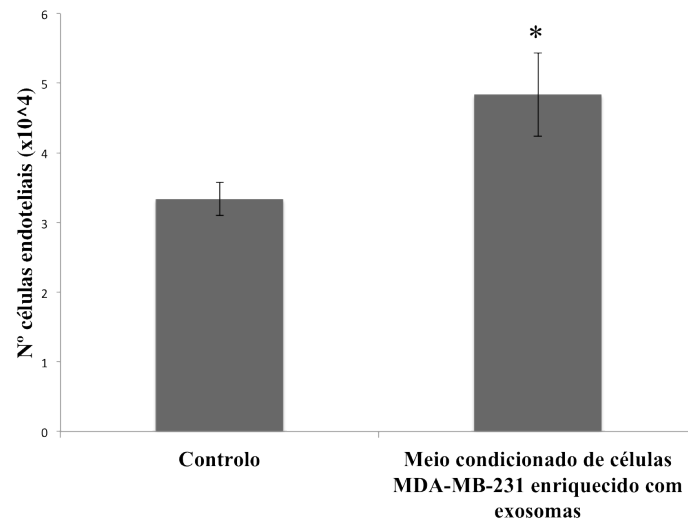
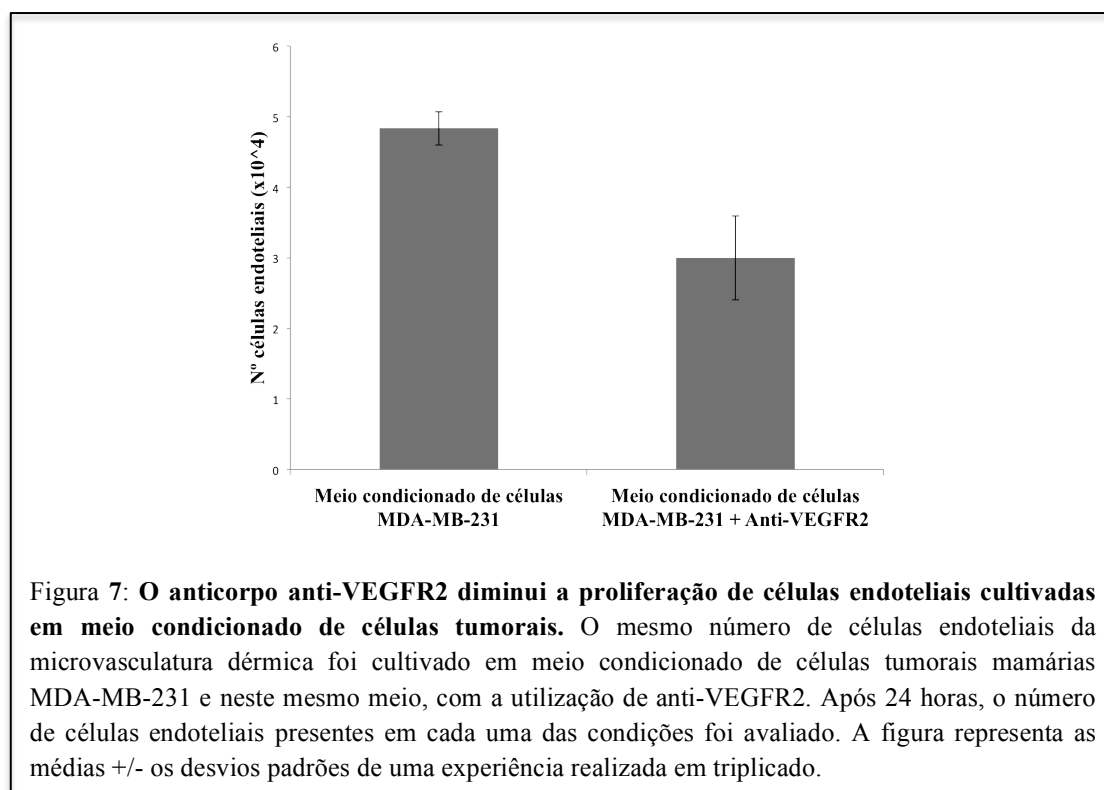


Figura 6: Exosomas produzidos por células tumorais promovem a proliferação de células endoteliais. O mesmo número de células endoteliais da microvasculatura dérmica foi cultivado em meio próprio ou meio enriquecido com exosomas produzidos por células tumorais mamárias MDA-MB-231. Ao fim de 24 horas, o número de células presentes em cada uma das condições foi avaliado. A figura representa as médias +/- os desvios padrões de uma experiência realizado em triplicados (* $p < 0.05$).

A adição de anti-VEGFR2 a células endoteliais da microvasculatura dérmica cultivadas em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 diminui a proliferação endotelial

Constatando-se que a libertação de exosomas produzidos por células tumorais mamárias MDA-MB-231 tem um efeito estimulador sobre a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica, procedemos à realização de um procedimento experimental no sentido de avaliar qual o efeito da presença de exosomas tumorais sobre a proliferação de células endoteliais, na presença de um anticorpo dirigido ao VEGFR2. Nesse sentido, o mesmo número de células endoteliais foi colocado a crescer em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 e em meio condicionado dessas mesmas células, porém adicionando anti-VEGFR2. Após 24 horas, procedeu-se à contagem do número de células endoteliais em cada uma das condições referidas, utilizando para isso um hemocítmetro e a viabilidade das células foi determinada por exclusão com

utilização de *Trypan blue*. Conforme representado no gráfico seguinte, verificou-se que, com a utilização de um anticorpo inibidor do VEGFR2, células endoteliais da microvasculatura dérmica colocadas em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 apresentam menor índice de proliferação, não tendo sido, contudo, essa diferença estatisticamente significativa.



Exosomas isolados a partir de células tumorais mamárias MDA-MB-231 modulam a morfogênese endotelial

Após demonstrarmos que exosomas libertados por células tumorais mamárias MDA-MB-231 estimulam a proliferação de células endoteliais da microvasculatura dérmica, fomos averiguar se este efeito se aplicava à formação de estruturas vasculares quando células endoteliais eram colocadas em Matrigel. Assim, o mesmo número de células endoteliais da microvasculatura dérmica foi colocado em Matrigel em três condições distintas: em DMEM suplementado com 10% FBS desprovido de exosomas, em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 e em meio condicionado

de células tumorais mamárias enriquecido com exosomas. Após 24 horas em cultura a 37°C, procedeu-se à observação através do microscópio óptico invertido.

Qualitativamente, constatou-se uma maior densidade de bifurcações formadas por células endoteliais da microvasculatura dérmica quando cultivadas em meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231, sendo que a densidade foi superior na presença de um meio enriquecido com exosomas tumorais previamente isolados. Paralelamente, procedeu-se à contagem do número de bifurcações presentes em cada uma das referidas condições, tendo-se verificado um número superior de células endoteliais no meio que esteve em contacto com células tumorais mamárias MDA-MB-231, sendo que o número de células foi superior na presença de um meio condicionado de células tumorais mamárias enriquecido com exosomas.

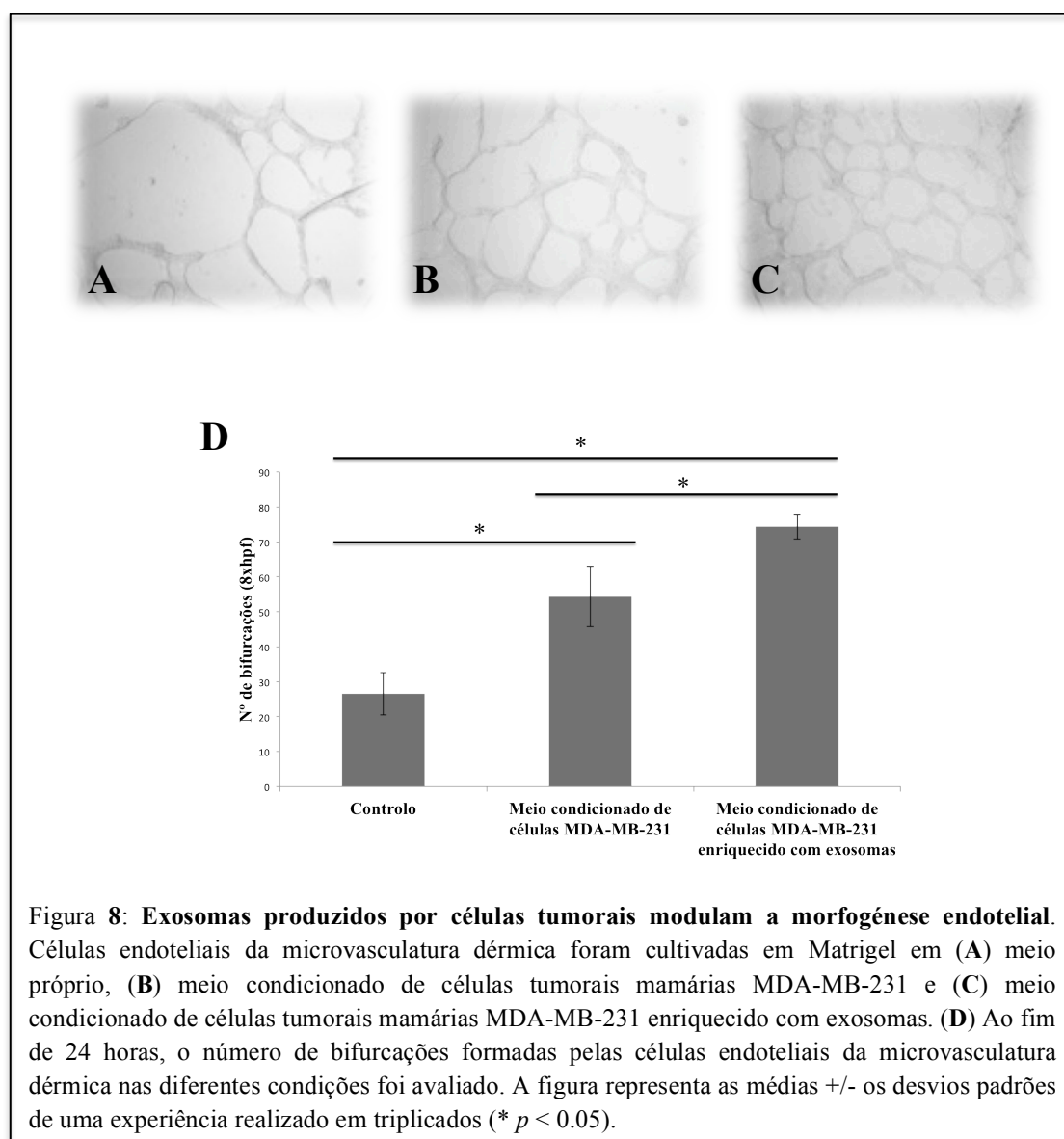


Figura 8: Exosomas produzidos por células tumorais modulam a morfogénese endotelial. Células endoteliais da microvasculatura dérmica foram cultivadas em Matrigel em (A) meio próprio, (B) meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 e (C) meio condicionado de células tumorais mamárias MDA-MB-231 enriquecido com exosomas. (D) Ao fim de 24 horas, o número de bifurcações formadas pelas células endoteliais da microvasculatura dérmica nas diferentes condições foi avaliado. A figura representa as médias +/- os desvios padrões de uma experiência realizado em triplicados (* $p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Reconhece-se, atualmente, que o desenvolvimento tumoral é um processo complexo e estritamente regulado por intermédio de diversos fatores de crescimento. A formação de um sistema vascular (angiogénese), ao permitir o aporte de substâncias necessárias à sustentabilidade e proliferação de células tumorais, constitui um factor limitante na evolução tumoral. Assim, existe uma relação entre o desenvolvimento tumoral e o processo de angiogénese, no qual o VEGF se assume como elemento central.

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que o bloqueio do sistema de sinalização associado ao VEGF não é, *per se*, suficiente para inibir o crescimento tumoral, atribuindo-se tal facto à existência de outras vias de sinalização celular independentes de VEGF. Paralelamente, micropartículas produzidas por células tumorais, nomeadamente os exosomas, têm merecido uma atenção crescente nos últimos anos no âmbito do estudo de mecanismos envolvidos no processo de angiogénese. De facto, constatou-se que células tumorais têm a capacidade de produzir elevadas quantidades de exosomas, os quais interagem com outras células presentes no microambiente tumoral. Admite-se que estes exosomas, por intermédio de mecanismos de comunicação intercelular ainda largamente desconhecidos, possam modular as características do microambiente tumoral.

No âmbito dos procedimentos experimentais desenvolvidos, demonstrámos que células tumorais mamárias MDA-MB-231 têm a capacidade de modular o potencial angiogénico de células endoteliais da microvasculatura dérmica. Concretamente, constatámos que células tumorais “educam” células endoteliais, nomeadamente a partir da libertação de fatores celulares para o meio envolvente, os quais modulam o potencial angiogénico de células endoteliais. Procedendo ao isolamento de exosomas produzidos por células tumorais mamárias MDA-MB-231, verificamos que estes estimulam a proliferação de células endoteliais, bem como a formação de redes vasculares. Por outro lado, sendo o VEGF um elemento central no processo de angiogénese, tal como esperado a utilização de um anticorpo dirigido ao VEGFR2 (receptor específico de células endoteliais), a sua inibição suprime o crescimento tumoral. No entanto, tal não é suficiente para inibir a proliferação de células

endoteliais, o que poderá estar relacionado com a existência de outras vias de sinalização e/ou recetores envolvidos no processo angiogénico. Por outro lado, convém ressaltar que o período de tempo no qual o procedimento experimental decorreu pode não ter sido suficiente para permitir avaliar o seu efeito modulador sobre as células a longo prazo, condição transversal aos ensaios realizados *in vitro*.

Os resultados apresentados sugerem que os exosomas podem, de facto, apresentar um papel importante na modulação do processo de angiogénese e, conseqüentemente, do desenvolvimento tumoral. Assim, serão necessários novos estudos no sentido de averiguar se este efeito modulatório por parte de células tumorais sobre células endoteliais é um efeito independente da via de sinalização associada ao VEGF e, assim, de que modo isto poderá acarretar a mudança de paradigma no que diz respeito à utilização de agentes anti-tumorais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Dias, por me ter facultado a oportunidade de desenvolver este projeto na sua Unidade, bem como pela sua disponibilidade, orientação, supervisão e revisão do projeto.

À Dra. Ana Luísa Magalhães, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto, nomeadamente a nível de execução técnica e contribuições valiosas para o trabalho.

Agradeço à Dra. Andreia Pinto (Unidade de Histopatologia do Instituto de Medicina Molecular) pela colaboração nos procedimentos de microscopia electrónica.

Por último, agradeço ao GAPIC e Fundação Calouste Gulbenkian, sem os quais a concretização deste projeto não teria sido possível, visto que a sua realização foi financiada no âmbito do 18.º Programa Educação para a Ciência - Bolsas Gulbenkian/FMUL de Investigação.

BIBLIOGRAFIA

1. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285:1182-1186.
2. Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Oncologist* 9(suppl 1):2-10.
3. Butler J.M., Kobayashi H., Rafii S. (2010) Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer* 2010,138-146.
4. Nagy J.A., Dvorak H.F. (2012) Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis* 29:657-662.
5. Vasudev N.S., Reynolds, A.R. (2014) Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17:471-494.
6. Welte J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 123(8):3190-3200.
7. Claesson-Welsh L. (2012) Blood vessels as targets in tumor therapy. *Upsala Journal of Medical Sciences* 117:178-186.
8. Tammela T., Zarkada G., Wallgard E., Murtomaki A., Suchting S., Wirzenius M., et al. (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454:656-60.
9. Brekken R.A., Thorpe P.E.. (2001) VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium. *J Control Release* 74:173-81.
10. Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillet N., Phillips H.S., Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:841-844.
11. Ribatti (2010) The inefficacy of antiangiogenic therapies. *Journal of Angiogenesis Research* 2010, 2:27.
12. Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Steinberg S.M., Chen H.X., Rosenberg S.A. (2003) A randomized trial of bevacuzimab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349(5):427-434.

13. Escudier B., et al. (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356(2):125-134.
14. Kindler H.L. (2007) Pancreatic cancer: an update. *Curr Oncol Rep.* 9(3):170-176.
15. Ohtsu A., et al. (2011) Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *J Clin Oncol.* 29(30):3968-3976.
16. Brantley-Sieders D.M., Dunaway C.M., Rao M., Short S., Hwang Y., Gao Y., Li D., Jiang A., Shyr Y., Wu J., Chen J. (2011) Angiocrine factors modulate tumor proliferation and motility through EphA2 repression of Slit2 tumor suppressor function in endothelium. *Cancer Res,* 71(3):976-987.
17. Kuo, J.C., Leung L., Tirnauer J.S. Overview of angiogenesis inhibitors. In *UpToDate* (acedido em Abril, 2016).
18. Jain R.K., Duda D.G., Clark J.W., Loeffler J.S. (2006) Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3:24-40.
19. Relf M., LeJeune S., Scott P.A., Fox S., Smith K., Leek R., Moghaddam A., Whitehouse R., Bicknell R., Harris A.L. (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factors, tumor growth factor β -1, platelet-derived growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57(5):963-969.
20. Nagy J.A., Chang S.H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer* 2009, 865-869.
21. Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 121:335-48.
22. Hannafon B., Ding W.Q. (2013) Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int. J. Mol.Sci.* 14:14240-14269.
23. Hood J.L., Pan H., Lanza G.M., Wickline S.A. (2009) Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Laboratory Investigation* 89:1317-1328.

24. Ohno S., Takanashui M., Sudo K., Ueda S., Ishikawa A., Matsuyama N., Fujita K., Mizutani T., Ohgi T., Ochiya T., Gotoh N., Kuroda M. (2013) Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy* vol. 21 no. 1, 185-191.
25. Raposo G., Stoorvogel W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. *J Cell Biol* Vol. 200 No. 4 373-383.
26. King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M. (2012) Hypoxic enhancement of exosomes release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012, 12:421.
27. Chari V.M., Clancy J.W., Sedgwick A., Schorey C.S. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science* 123:1603-1611.
28. Johnson C.D., Esquela-Kerscher A., Stefani G., Byrom M., Kelnar K., Ovcharenko D. (2007) The let-7 micro-RNA repress cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67:7713-7722.
29. Record M. (2013) Exosomal Lipids in Cell-Cell Communication. *Emerging Concepts of Tumor Exosome-Mediated Cell-Cell Communication*. Zhang, H.-G., Ed. Springer, NY, USA, 2013; pp. 47-68.
30. Zoller, M. (2009) Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews Cancer* 9, 40-55.