

Aline Lopes Ribeiro

**Lisil oxidase e propriedades pró-
tumorigênicas de pericitos**

Lysyl oxidase and pro-tumorigenic properties
of pericytes

São Paulo

2015

Aline Lopes Ribeiro

**Lisil oxidase e propriedades pró-
tumorigênicas de pericitos**

Lysyl oxidase and pro-tumorigenic properties
of pericytes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em CIÊNCIAS, na Área de BIOLOGIA/GENÉTICA.

Orientador: Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2015

Ribeiro, Aline

Lisil oxidase e propriedades pró-tumorigênicas de pericitos

80 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Microambiente tumoral 2. Pericitos 3. Lisil oxidase I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador

Dedicatória

À minha mãe, meu grande exemplo
de mulher guerreira e persistente

Agradecimentos

À minha mãe, pelo amor e dedicação incondicionais.

À minha tia mara-quase mãe e os primos-quase irmãos, Will e Karine, por tudo que eu sou e alcancei até aqui. Cada etapa cumprida só foi possível graças ao amor e exemplo de família que sempre me ofereceram.

À minha tia-irmã Fernanda, por ser minha melhor amiga e minha grande força em todos os momentos.

Ao meu amigo João, por uma lista infinita que não seria possível escrever, mas resumida em atenção e ajuda em todos os momentos. Obrigada por todas as mensagens de “levanta logo e vai trabalhar”, rs. Espero que um dia eu consiga expressar o quanto você foi fundamental para a conclusão desta etapa.

Ao Luiz Paulo. Você me ajudou e atrapalhou, rs. Mas sabe o quanto seu apoio e conselhos me ajudaram quando precisei. Você me instiga a ser maior.

Ao “Quinteto Fantástico”: Midori, Gabriel, Hélio e Ju. Vocês são os melhores amigos do mundo. Como eu sou grata por ter vocês na minha vida! Obrigada pelas risadas e apoio.

Ao meu orientador, Keith, uma grande inspiração como professor e pesquisador. Obrigada por toda a paciência e dedicação.

Ao time feminino do laboratório do Prof. Keith: Bia, Marina, Tamara, Patrícia, Kaid e Carol. Vocês são o melhor exemplo de grandes mulheres atuando na ciência. Obrigada por todos os conselhos, conversas e ensinamentos, sobre o trabalho e sobre a vida. Pati e Kaid, obrigada por não me deixarem desistir.

À Patrícia Semedo, especialista do laboratório, pelo auxílio nos experimentos.

À todos os alunos dos demais laboratórios do CEPID, pela disposição em ajudar sempre que necessário. Em especial, a Juliana Gomes por me ajudar na luta com os pericitos e ao Marcos Valadares pelo árduo trabalho prévio na obtenção dessas células.

À todos os funcionários do IB/USP, por todo auxílio oferecido.

Às agências de fomento, FAPESP (CEPID), CNPq INCT e Capes que possibilitou a exceção deste trabalho

Índice

I. Introdução	07
1. Microambiente tumoral	09
2. Pericitos	15
3. Pericitos e câncer	18
4. Lisil oxidase	21
5. Lisil oxidase e câncer	23
II. Objetivos	26
III. Materiais e Métodos	27
IV. Resultados	36
V. Discussão	58
VI. Conclusões	65
VII. Resumo	66
VIII. Abstract	67
IX. Referências Bibliográficas	68
X. Biografia	78

Introdução

Câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsável por cerca de 14 milhões de novos casos somente em 2012 e acarretando 8,2 milhões de mortes por ano, uma estimativa de 13% de todas as causas de morte no mundo. Projeta-se que haja um aumento de 70% na ocorrência de câncer nas próximas duas décadas em consequência do crescimento e envelhecimento da população (GLOBOCAN, 2012).

Trata-se de um conjunto de mais de cem doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. O tipo de câncer com maior taxa de mortalidade é, em primeiro lugar, o câncer de pulmão, seguido do câncer de fígado, colorretal, de mama e de esôfago. Cerca de 80% dos casos da doença são de origem multifatorial, estando relacionados a fatores ambientais como exposição a agentes químicos e físicos, estilo de vida e hábitos alimentares. Os principais fatores de risco atualmente são: o tabagismo, consumo excessivo de álcool e sedentarismo (GLOBOCAN, 2012). Para a maioria dos tipos de câncer, a taxa de incidência aumenta com o avançar da idade.

O processo de formação do câncer – denominado carcinogênese – envolve uma complexa sequência de alterações genéticas que, coletivamente, afetam uma série de funções biológicas necessárias a homeostase de uma célula normal. O câncer se desenvolve em múltiplas etapas que, usualmente, podem ser divididas em três estágios principais: iniciação, promoção e progressão (BERENBLUM; SHUBIK, 1947).

Na iniciação, a célula de um tecido normal que se encontra em um estado de instabilidade genética pode acumular diversas mutações irreversíveis, tornando-se neoplásica. Essa sequência de mutações em cascata pode, então, levar a um desequilíbrio,

gerando células altamente proliferativas e invasivas. A aquisição desse fenótipo maligno ocorre de forma lenta e gradual, no estágio de promoção. Por fim, uma vez instalado o câncer, o tumor inicia a fase de progressão, na qual se desenvolvem os vasos sanguíneos e a capacidade metastática (DEVI, 2004).

Com o avanço dos estudos na área, foi possível consolidar uma lista de critérios necessários e suficientes à progressão tumoral, que têm sido corroborados e aperfeiçoados ao longo dos últimos anos. Entre eles estão: (1) perda do controle da proliferação celular; (2) imortalização da célula, principalmente, devido à ativação da enzima telomerase; (3) alterações cromossômicas; (4) perda das propriedades adesivas da membrana plasmática; (5) perda da capacidade de diferenciação ou especialização; (6) habilidade de invadir tecidos adjacentes e formar metástases; (7) indução da angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Os tratamentos para o câncer geralmente incluem métodos clássicos como remoção cirúrgica, quimioterapia e/ou radioterapia, bem como métodos mais avançados como os baseados em terapias-alvo. Uma das principais dificuldades na erradicação total das células tumorais consiste na extensa heterogeneidade celular, o que impossibilita a identificação de alvos únicos que atinjam todo o tumor (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013). Além disso, é importante ressaltar que o crescimento tumoral depende não apenas das células tumorais *per se*, mas também do seu microambiente circundante, que pode afetar e controlar sua evolução desde estágios iniciais até os mais tardios.

1. Microambiente tumoral

As células de um tecido normal se comunicam dinamicamente entre si via junções, receptores, hormônios e outros fatores solúveis. Há uma vasta rede de sinalização crucial para a manutenção da arquitetura tecidual desencadeada essencialmente por meio do contato célula-célula, célula-matriz extracelular e por moléculas sinalizadoras. Dada sua importância, desestabilizações da homeostase de um tecido podem também promover a aquisição de um fenótipo maligno.

Durante todo o seu desenvolvimento, os tumores competem com o microambiente normal para superar as pressões antitumorígenicas. O tumor deve ser capaz de adquirir vantagens que o permitam sobreviver e crescer sem que seja notado, por exemplo, pelo sistema imune hospedeiro. As células tumorais, portanto, exercem grande influência sobre o microambiente circundante, modificando-o de um estado normal a um estado que suporte e permita seu crescimento sustentado, sua invasão e resistência aos mecanismos de defesa do organismo.

O microambiente tumoral abrange todas as células não neoplásicas presentes no tumor, a matriz extracelular e as moléculas sinalizadoras. Os principais componentes celulares incluem fibroblastos, células do sistema imune e células que compõem os vasos sanguíneos, como células endoteliais e pericitos. Adicionalmente, células-tronco mesenquimais e adipócitos também podem estar associadas aos tumores e conferirem propriedades pró-tumorigênicas.

Uma das primeiras evidências da interação entre as células tumorais e seu microambiente foi descrita já em 1971 no clássico trabalho de Folkman e colaboradores, no qual foi proposta a ação de um fator angiogênico (TAF, *Tumor Angiogenic Fator*) que seria liberado pelas células tumorais e atuaria sobre as células endoteliais, estimulando

sua proliferação. Anos mais tarde, o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Fator*) foi identificado como uma molécula essencial para a formação de novos vasos, o que significou uma grande oportunidade terapêutica e ganhou grande foco nos estudos da área (FERRARA; HENZEL, 1989).

Estudos recentes têm apontado novas funções para as células vasculares na promoção de um nicho pró-tumoral que vão além do seu papel na angiogênese. Em especial, as células endoteliais podem contribuir para propriedades como proliferação, sobrevivência, manutenção do fenótipo indiferenciado e capacidade metastática (GHAJAR et al., 2013; GHIABI et al., 2014; LU et al., 2013; NEIVA et al., 2009; ZHANG et al., 2014). Os pericitos também têm fundamental relevância durante o desenvolvimento do câncer e serão tratados separadamente na próxima sessão.

Outra interação clássica entre as células tumorais e o microambiente pode ser elucidada pelas ações das células do sistema imune sobre o desenvolvimento do câncer. Conjuntamente, elas possuem notável influência sobre a iniciação, crescimento e disseminação do tumor, além de se comunicarem extensivamente com as demais células estromais.

Uma das células mais abundantes nos tumores e presentes em todos os estágios da carcinogênese são os macrófagos. Essas células possuem uma plasticidade inerente e são altamente responsivas aos estímulos do ambiente. Sendo assim, os macrófagos podem ser induzidos, dentro do contexto do tumor, a passarem de um estado “reativo”, isto é, no qual participam da imunovigilância; para um estado no qual induzem a tolerância e atuam favor da progressão tumoral (KITAMURA; QIAN; POLLARD, 2015).

Os macrófagos podem realizar suas ações pró-tumorigênicas por meio de diversos mecanismos. Essas células podem atuar como imunossupressoras prevenindo o reconhecimento do tumor pelas células NK (*Natural Killer*) e pelos linfócitos T durante

ao longo do avanço do tumor e também após a recuperação da quimio- e imunoterapia, contribuindo para a recidiva da doença (MANTOVANI; SICA, 2010).

Além de modular a resposta imune, os macrófagos podem estimular a angiogênese, aumentar a motilidade e invasão por meio da secreção de proteases que atuam sobre a matriz extracelular, além de promoverem o extravasamento das células tumorais no sítio pré-metastático e auxiliarem na sua sobrevivência e crescimento local (NOY; POLLARD, 2014). Os tumores sólidos podem, inclusive, ser estratificados com base na presença de macrófagos infiltrados, uma vez que seus altos níveis são frequentemente correlacionados a um maior potencial metastático, aumento na vascularização e pior prognóstico (ZHANG et al., 2012).

As demais células do sistema imune, incluindo linfócitos T regulatórios, células dendríticas, células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC) e leucócitos, também atuam por mecanismos similares e agem sinergicamente com os macrófagos, criando um microambiente tolerante ao desenvolvimento tumoral. Por essa razão, a presença dessas células tem sido associada a uma pior evolução da doença (CONDAMINE et al., 2015; NISHIKAWA; SAKAGUCHI, 2014; SHEN et al., 2014).

Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs, *Cancer Associate Fibroblasts*) são outros componentes do microambiente tumoral cujas funções estão fortemente associadas ao crescimento do tumor e a sua disseminação. A infiltração de fibroblastos ativados tem sido associada a um pior prognóstico e maior dificuldade no tratamento em diversos tipos de câncer, principalmente, em câncer de pulmão e mama (PAULSSON; MICKE, 2014).

Quando ativados, os fibroblastos são capazes de secretar quimiocinas inflamatórias e diversos fatores de crescimento; remodelar a matriz extracelular, por meio da deposição de colágeno, laminina, fibronectina, e pela secreção de metaloproteinases (MMPs); promover a angiogênese; regular a inflamação; atuar sobre a manutenção e

motilidade de células-tronco tumorais; e suportar, não apenas o crescimento tumoral local, mas também sua invasão e metastatização em um sítio secundário.

Em um trabalho recente, foi demonstrado que alguns tratamentos quimioterápicos clássicos podem, como consequência, induzir alterações metabólicas no microambiente tumoral que resultam em uma transformação maligna dos fibroblastos locais. Estas células, por sua vez, se tornam fonte de citocinas inflamatórias que atuam ativando células epiteliais adjacentes, contribuindo para o processo tumorigênico em modelo de câncer de mama (PEIRIS-PAGÈS; SOTGIA; LISANTI, 2015). Este mecanismo ilustra a complexa interação entre células do microambiente que ativamente participam da sobrevivência e progressão tumoral.

Além dos componentes celulares, a matriz extracelular é de grande relevância para a manutenção da homeostase dos tecidos, uma vez que possui um papel que não se limita a organização estrutural, mas também é responsável por direcionar bioquímica e biomecânica o crescimento, a sobrevivência, a migração e a diferenciação das células, além de modular processos importantes como o desenvolvimento vascular e as funções imunes. Dessa forma, quaisquer anormalidades na matriz extracelular podem estar intimamente associadas a uma transformação neoplásica (LU; WEAVER; WERB, 2012; PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014).

Uma mecanismo geral que exemplifica a importância da interação entre os diversos componentes do microambiente tumoral e a matriz extracelular consiste na secreção de moléculas sinalizadoras, como TGF- β , pelas células tumorais, que irão ativar fibroblastos associados ao câncer e estimular a produção de proteases remodeladoras e proteínas específicas, modificando a composição e, portanto, a rigidez da matriz extracelular (GILKES; SEMENZA; WIRTZ, 2014). Em modelo de câncer colorretal, foi demonstrado que a utilização de inibidores da via de sinalização do TGF- β bloqueia

drasticamente a comunicação entre as células tumorais e fibroblastos, afetando o avanço do tumor (CALON et al., 2015).

Portanto, tem se tornado evidente que há uma orquestrada interação entre as células tumorais e seu microambiente que age em favor e suporta a progressão tumoral. De maneira geral, as células tumorais secretam citocinas, quimiocinas e enzimas que ativam as células estromais. Estas, por sua vez, secretam outras moléculas que irão auxiliar na construção um contexto mais propício a aquisição e manutenção do fenótipo maligno das células tumorais.

Diversas pesquisas apontam que além de auxiliar o desenvolvimento tumoral, os componentes do estroma também possuem efeitos significativos sobre a eficácia terapêutica, tanto na promoção de resistência quanto contribuindo positivamente para a resposta de terapias combinadas.

O microambiente tumoral está associado a aquisição de resistência a drogas anti-câncer por vários mecanismos (CASTELLS et al., 2012). Entre eles, está a secreção de fatores de crescimento, sobrevivência e anti-apoptóticos que, em geral, ativam vias que não são comumente alvos das terapias convencionais e, portanto, contribuem para o reestabelecimento do tumor após os tratamentos (KLEMM; JOYCE, 2015; SUN, 2015). Além disso, o microambiente tumoral pode afetar a penetração das drogas em regiões mais internas do tumor, diminuindo o seu campo de ação (QUAIL; JOYCE, 2013).

Um dos fatores mais agravantes do câncer de pâncreas, por exemplo, é o desenvolvimento de quimioresistência. Foi demonstrado que os fibroblastos possuem um papel importante neste aspecto, aumentando consideravelmente a resistência a indutores de apoptose por meio do estímulo da secreção de IL-1 β pelas células tumorais. Esta interleucina é um importante fator mediador de resistência neste tipo de câncer (ARLT et al., 2002; MÜERKÖSTER et al., 2004).

Sendo assim, o potencial do microambiente tumoral tem sido cada vez mais explorado como alvo de terapias combinadas anti-câncer. Atingir as células tumorais, bem como seu estroma celular, pode ser estratégia terapêutica interessante para superar as limitações recorrentes nos tratamentos usualmente aplicados.

Atualmente, drogas que atuam sobre o microambiente tumoral já são comumente utilizadas com êxito na clínica, como as tradicionais terapias que visam modular a angiogênese e as mais avançadas cuja abordagem é o bloqueio dos pontos de controle da resposta imune (KLEMM; JOYCE, 2015).

Por fim, o estudo da associação entre os componentes do microambiente tumoral a agressividade e evolução da doença tem sido um campo recentemente explorado e promissor. Um trabalho recente, demonstrou que a avaliação da expressão gênica de células do estroma pode aumentar consideravelmente poder preditivo da classificação molecular de câncer colorretal. Por meio de análises de bioinformática e imunohistoquímica, foram identificados marcadores estromais significativamente associados com desfecho da doença (CALON et al., 2015).

Uma vez que o microambiente contribui para muitos aspectos da carcinogênese e oferece alvos promissores para terapias, é crucial investigar os mecanismos pelos quais age sobre as células tumorais durante o processo de aquisição e manutenção do fenótipo maligno. A melhor compreensão da comunicação entre células tumorais e o seu microambiente continuará contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias para erradicação do câncer.

2. Pericitos

Os pericitos foram primeiramente descritos no século XIX como células adventícias que se encontravam isoladas na parede externa de capilares (ROUGET, 1873). O termo “pericito” foi somente aplicado em 1923 para definir células com morfologia característica, inseridas na membrana basal e em contato direto com o endotélio de microvasos (ZIMMERMANN, 1923).

Estão ubiquamente distribuídos em capilares, arteríolas pré-capilares, vênulas pós-capilares e vênulas coletoras em todos os tecidos do corpo. Contudo, sua densidade e extensão sobre o endotélio variam bastante entre os órgãos e redes vasculares (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; HIRSCHI; D'AMORE, 1996). A vasculatura do sistema nervoso central é considerada a mais rica em pericitos, com cerca de 30% da sua superfície apical coberta por essas células.

Os pericitos possuem morfologia alongada e emitem prolongamentos citoplasmáticos que se estendem longitudinalmente e ao redor de capilares, arteríolas pré-capilares, vênulas pós-capilares e vênulas coletoras. Geralmente, essas ramificações abrangem várias células endoteliais e podem, inclusive, interligar capilares vizinhos (ALLT; LAWRENSEN, 2001; ARMULIK; ABRAMSSON; BETSHOLTZ, 2005).

Além da localização tecidual e da morfologia celular, a expressão de certas proteínas específicas também pode ser complementarmente utilizada para caracterizar pericitos, embora marcadores específicos desse tipo celular ainda não tenham sido encontrados. Os principais marcadores utilizados são o receptor de fator de crescimento PDGFR β e o proteoglicano NG2, que funciona como co-receptor para o PDGF. Além disso, CD146 e α -SMA também são frequentemente aplicados nos estudos. Porém, é importante ressaltar que a expressão desses marcadores pode variar de acordo com o tipo de tecido, estágio

de maturação e em condições patológicas (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; SCHLINGEMANN et al., 1991).

Recentemente, duas subpopulações de pericitos foram identificadas com base na expressão diferencial da proteína Nestina. Por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que esses dois tipos de pericitos apresentam propriedades funcionais distintas, variando quanto a sua multipotencialidade e capacidade angiogênica. Adicionalmente, apenas um dos subtipos (pericitos com expressão positiva de Nestina) parece ser recrutado durante a angiogênese tumoral (BIRBRAIR et al., 2014).

Os pericitos desempenham um importante papel estrutural na estabilização dos vasos, proporcionando um importante suporte mecânico à camada de células endoteliais. Entretanto, possuem também diversas funções dinâmicas, uma vez que participam ativamente da maturação dos vasos, do controle da filtração e do fluxo sanguíneo capilar, e por atuarem como moduladores e guias durante o processo de formação de novos vasos (BERGERS; SONG, 2005; EGGINTON et al., 2000).

A angiogênese é iniciada quando há desequilíbrio em favor dos fatores pró-angiogênicos. Neste contexto, os pericitos passam para um estado ativado, no qual sofrem alterações fenotípicas e funcionais que favorecem sua migração, proliferação e diferenciação. Durante todas as etapas da angiogênese ocorre uma importante sinalização parácrina e direta entre os pericitos e as células endoteliais que também é estimulada nessas condições (ARMULIK; ABRAMSSON; BETSHOLTZ, 2005; GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003).

Resumidamente, na primeira etapa da angiogênese, os pericitos se dissociam da parede dos vasos pré-existentes, enquanto a membrana basal e matriz extracelular são degradadas principalmente por proteases secretadas pelos próprios pericitos. As células endoteliais, então, migram para o espaço perivascular, onde proliferam numa orientação

guiada pelos pericitos. Por fim, as células endoteliais aderem e criam o lúmen, seguidas pela recomposição da membrana basal e pelo recrutamento dos pericitos (OZERDEM; STALLCUP, 2004; STAPOR et al., 2014).

Sendo assim, os pericitos possuem papel central durante o processo angiogênico e sua disfunção prejudica grandemente a formação dos vasos. Este cenário foi demonstrado em estudo utilizando camundongos nos quais a migração dos pericitos foi bloqueada. Estes animais apresentavam hiperplasia endotelial, aumento do diâmetro capilar, forma e ultraestrutura anormal das células endoteliais, mudanças na distribuição de proteínas de junções intercelulares e aumento da permeabilidade através do endotélio (HELLSTRÖM et al., 1999).

Outra propriedade interessante dos pericitos é a sua multipotencialidade. Já em 1978, foi demonstrada a capacidade de se diferenciarem células de músculo liso vasculares em condições de hipóxia durante o remodelamento ou regulação do diâmetro dos vasos (MEYRICK; REID, 1978). Já foi verificada sua diferenciação em fibroblastos durante a reparação de tecidos e inflamação (SUNDBERG et al., 1996); e em adipócitos, osteócitos e condrócitos, sob certos estímulos *in vitro* (CRISAN et al., 2009; FARRINGTON-ROCK et al., 2004). Além disso, pericitos derivados do sistema nervoso central parecem serem capazes de gerarem células da linhagem neural (DORE-DUFFY et al., 2006; NAKAGOMI et al., 2015).

A contribuição dos pericitos já foi demonstrada para o desenvolvimento de algumas doenças. A perda de atividade ou redução na proporção de pericitos está associada a doenças como fibrose, retinopatia diabética, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e uma variedade de angiopatias (HAMMES, 2005; SCHRIMPF; DUFFIELD, 2011; YAMAGISHI; IMAIZUMI, 2005; ZLOKOVIC, 2008). Além disso, a proliferação anormal dessas células pode estar relacionada à sua transformação, acarretando em

doenças malignas hematológicas, tais como hemangiomas e pericitomas, bem como na formação de tumores sólidos (DORE-DUFFY; CLEARY, 2011). Por fim, a diferenciação disfuncional dentro da parede vascular pode causar microcalcificações dentro de vasos de pequeno calibre ou mesmo a deposição de gordura nas paredes vasculares (CANFIELD et al., 2000).

3. Pericitos e câncer

Dada sua importância para a angiogênese, os pericitos são fundamentais para o crescimento tumoral após um tamanho que exija suprimento de nutrientes e oxigênio. Durante a formação de novos vasos tumorais, os pericitos são recrutados de forma alterada e a arquitetura vascular não completa a maturação. Além disso, os pericitos possuem menor associação com a camada de células endoteliais. Como consequência, vasos tumorais são altamente desorganizados, com formas irregulares, tortuosos e excessivas ramificações, além serem mais suscetíveis ao extravasamento (BARLOW et al., 2013; RAZA; FRANKLIN; DUDEK, 2010).

Estudos clínicos encontraram uma correlação significativa entre a extensão da cobertura de pericitos nos vasos tumorais e o prognóstico de alguns tipos de câncer. Em melanoma e carcinoma das células renais, o aumento do número de pericitos foi associado a características mais agressivas desses tumores., resistência à terapia e desfecho mais desfavorável (CAO et al., 2013; GEE et al., 2003). Em contraste, a ausência de pericitos parece estar envolvida com a facilitação da metástase em câncer colorretal (YONENAGA et al., 2005).

Em modelo murino de melanoma, demonstrou-se que a superexpressão do fator PDGF- β nas células tumorais resulta em um aumento do recrutamento de pericitos, o que,

por sua vez, está associado a um crescimento tumoral mais acelerado e uma maior estabilização da neovasculatura do tumor (FURUHASHI et al., 2004).

A deficiência de pericitos leva a formação de vasos tumorais alterados, provocando uma condição de hipóxia e menor crescimento dos tumores (MILJKOVIC-LICINA et al., 2012). Em um estudo *in vivo*, mostrou-se que a eliminação seletiva de pericitos do estroma de um tumor de glioblastoma causa a ruptura das paredes endoteliais e faz com que os lúmens dos vasos tumorais se colabem, retardando, assim, a progressão tumoral. Ainda neste trabalho, foi demonstrado que cerca de 70% dos pericitos que se encontram no tumor de glioblastoma humano são derivados de células-tronco tumorais (CHENG et al., 2013)

Em contraste, quando o recrutamento dos pericitos é bloqueado, apesar dos efeitos no crescimento, é observado um aumento da ocorrência de metástases. Foi demonstrado em modelo animal transgênico, que a deficiência de pericitos e o comprometimento de suas interações com as células endoteliais eleva o potencial metastático das células tumorais (XIAN et al., 2006).

Os mecanismos subjacentes a estas observações ainda não foram totalmente elucidados. Uma hipótese é a de que os pericitos podem atuar como barreiras físicas que limitam o extravasamento das células tumorais para o lúmen vascular. Além disso, o prejuízo da estrutura vascular sem a cobertura adequada de pericitos, aumenta o volume plasmático e a pressão local, o que parece também contribuir para esse processo. Por fim, a condição de hipóxia gerada pode induzir a transição epitélio-mesenquimal e, conseqüentemente, favorecer a invasão das células tumorais (COOKE et al., 2012). Os principais aspectos da influência de pericitos sobre o efeito no crescimento tumoral e formação de metástases estão resumidos na Figura 1.

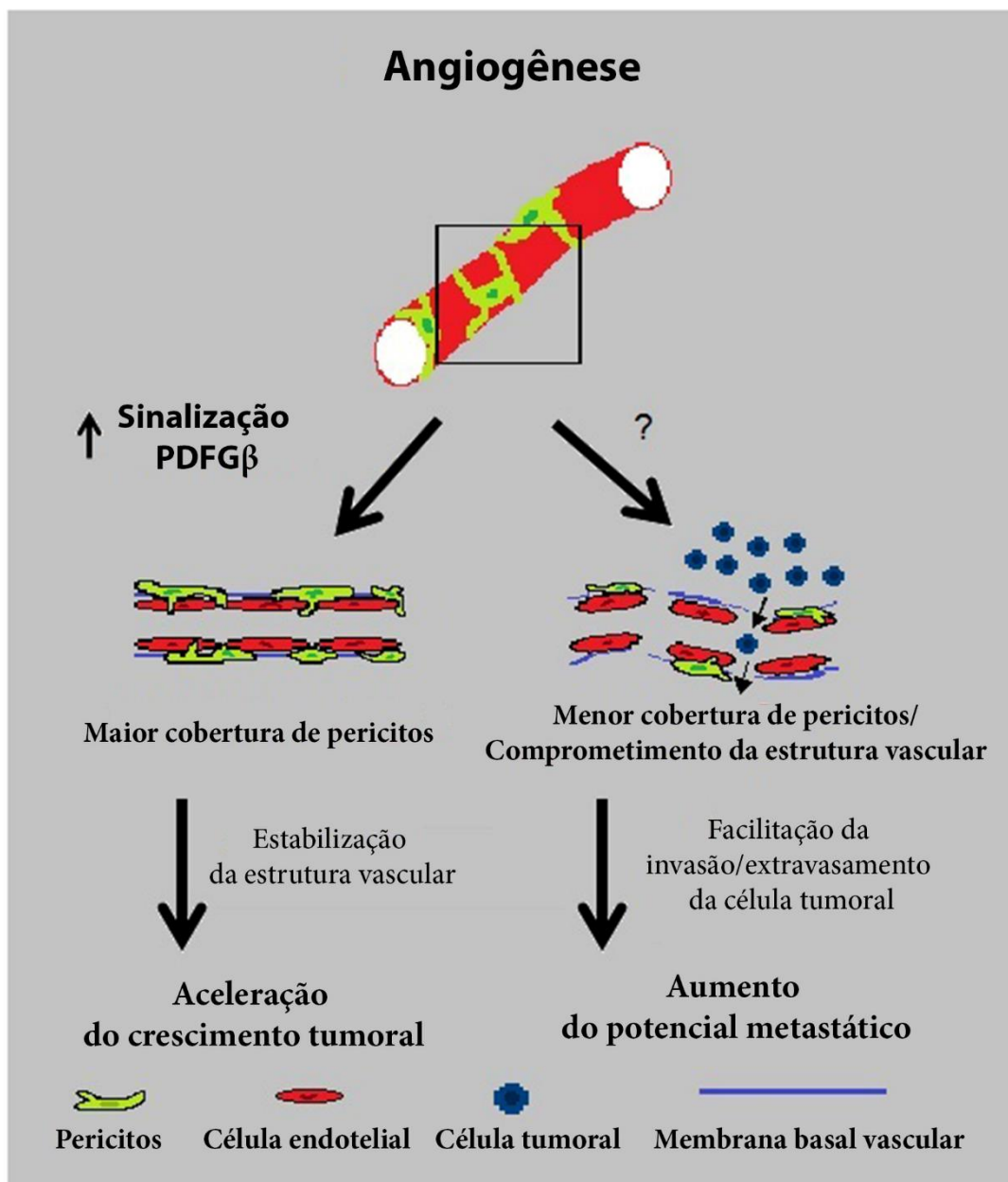


Figura 1. Esquema ilustrando os efeitos decorrentes da cobertura anormal de pericitos nos vasos tumorais. A sinalização do PDGF- β controla o recrutamento de pericitos durante a angiogênese. A hiperativação desta via no microambiente tumoral pode estar envolvida com o aumento da cobertura de pericitos. Conseqüentemente, há uma melhora na estabilidade da vasculatura e aumento da perfusão sanguínea, o que favorece o crescimento do tumor. Em contraste, a menor cobertura de pericitos compromete a integridade da estrutura dos vasos, tornando-o mais permeável e facilitando a invasão ou extravasamento de células tumorais. Estas condições podem, então, aumentar o potencial metastático do tumor. Adaptado de RIBEIRO; OKAMOTO, 2015.

Além do importante papel na angiogênese e metástase tumoral, já foi descrito que os pericitos podem influenciar na capacidade de infiltração das células do sistema imune e até mesmo na resistência do tumor à quimio e radioterapia (OCHS et al., 2013; WANG et al., 2012; ZHANG; NISHIHARA; KANO, 2012).

Alguns trabalhos sugerem que a inibição concomitante de ambas as células, endoteliais e pericitos, promove um melhor efeito antitumoral em comparação ao bloqueio de qualquer uma das duas células isoladamente (BERGERS et al., 2003). Quando as terapias são direcionadas às células endoteliais tumorais, os pericitos geralmente são capazes de manter os vasos sanguíneos pré-existentes funcionais, favorecendo a recidiva tumoral (CARMELIET; JAIN, 2011).

Outra evidência de que os pericitos são fundamentais para a proteção das células endoteliais e para promover a resistência à terapêutica foi a observação de que os vasos tumorais com menor extensão de pericitos envolvendo a superfície endotelial parecem ser mais vulneráveis à radiação e à quimioterapia (BERGERS et al., 2003; FRANCO et al., 2011)

Sendo assim, aprofundar o conhecimento acerca das funções e dos mecanismos dessas células no microambiente tumoral pode ser essencial para uma melhor compreensão do papel do estroma na progressão tumoral, além de futuramente poder contribuir para a identificação de um novo alvo terapêutico.

4. Lisil oxidase

Lisil oxidase (LOX) é a enzima responsável por catalisar a modificação química pós-traducional que permite a ligação covalente cruzada entre as cadeias laterais do colágeno e da elastina, estabilizando os componentes fibrosos da matriz extracelular. Sendo assim,

possui um importante papel na morfogênese e no reparo de tecidos conjuntivos de diversos órgãos do corpo (KAGAN; LI, 2003; SMITH-MUNGO; KAGAN, 1998).

A LOX é sintetizada como uma pré-pro-proteína contendo uma sequência sinal N-terminal. Durante a passagem pelo complexo de Golgi, essa sequência é removida, produzindo a pró-LOX, que é, por sua vez, secretada na forma inativa. Somente em uma etapa posterior, a enzima será ativada por proteólise (TRACKMAN et al., 1992).

Quatro outras enzimas, com diferentes graus de similaridade com LOX, foram descritas e constituem uma família de proteínas relacionadas: LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4, e que estão representadas na Figura 2 (MOLNAR et al., 2003).

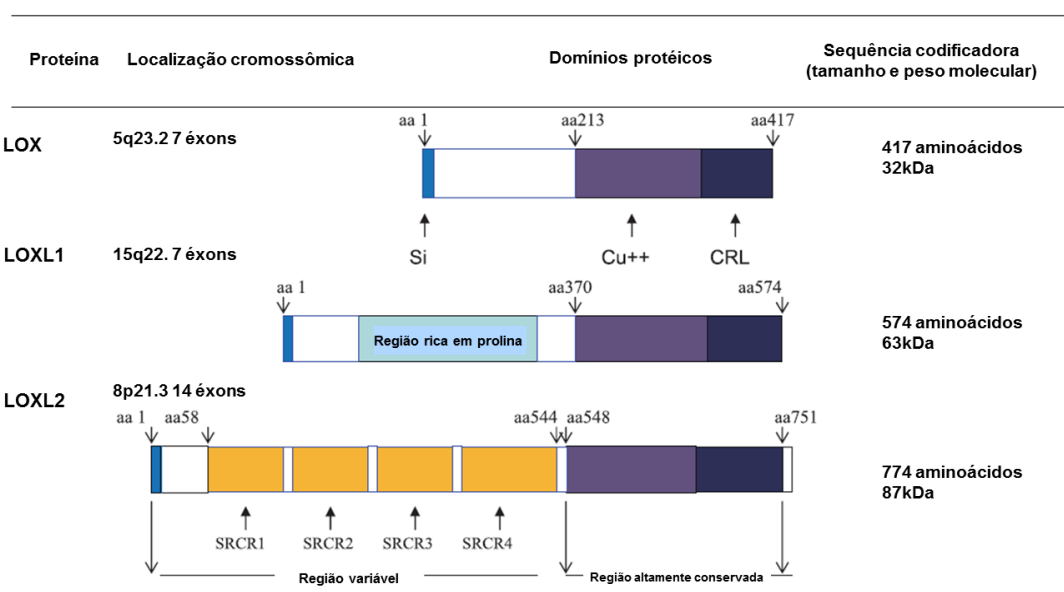


Figura 2. Representação esquemática da LOX, LOXL1 e LOXL2. As LOXL3 e 4 possuem composição similar a LOXL2. Si: peptídeo sinal; Cu⁺⁺: domínio do sítio catalítico contendo cobre; CRL: Domínio do receptor similar ao de citocinas; SRCR: domínio rico em cisteína. Adaptado de NISHIOKA; EUSTACE; WEST, 2012.

A região C-terminal, que codifica o domínio de ligação ao cobre e o sítio catalítico, é altamente conservada entre os membros da família LOX. De forma contrária, a extremidade N-terminal é formada por regiões de sequências variáveis entre as proteínas.

As LOXL (*lysyl oxidase like*) exibem efeitos biológicos e distribuição que indicam que também são importantes na ligação colágeno-elastina, assim como a própria LOX (CSISZAR, 2001).

No entanto, além de colágeno e elastina, a LOX pode oxidar a lisina presente em uma grande variedade de proteínas catiônicas, o que sugere que as suas funções se estendem além da estabilização da matriz extracelular. Descobertas recentes revelam que as proteínas LOX e LOXL marcadamente influenciam o comportamento celular, incluindo respostas quimiotáticas, proliferação e mudanças entre os fenótipos normais e malignos (PERRYMAN; ERLER, 2014).

A expressão e atividade aberrantes dessas enzimas foram descritas em diversas doenças associadas à matriz extracelular, como endometriose (DENTILLO et al., 2010), doenças cardiovasculares (RODRÍGUEZ et al., 2008) e fibrose (RIMAR et al., 2014); mas também em uma grande variedade de tipos de câncer, como de próstata (BAIS et al., 2015), de mama (MOHAMMED et al., 2015), e colorretal (WARD et al., 2014).

5. Lisil oxidase e câncer

Embora durante bastante tempo tenha-se pensado que a LOX possuía a função única de atuar sobre a maturação da matriz extracelular, estudos mais recentes têm fornecido diversas evidências do envolvimento desta enzima em muitos outros processos biológicos importantes, como a indução da motilidade e migração de alguns tipos de células, por exemplo, monócitos e células do músculo liso vascular; além da sua influência sobre a proliferação e diferenciação celular (KAGAN; LI, 2003; LUCERO; KAGAN, 2006; TRACKMAN; SAXENA; BAIS, 2015).

Dada a sua relevância, a expressão e atividade da LOX têm sido avaliadas em vários tipos de câncer e, em geral, como resultado observamos que a sua regulação alterada está associada à tumorigênese e progressão tumoral (NISHIOKA; EUSTACE; WEST, 2012; PERRYMAN; ERLER, 2014).

Já foi demonstrado que a LOX e outros membros da família são superexpressos em linhagens de tumor de mama com características mais agressivas e invasivas em comparação àquelas com menor capacidade de invasão (EL-HAIBI et al., 2012; KIRSCHMANN et al., 2002). O mesmo foi reportado para outros tipos tumorais, como câncer colorretal (COX; ERLER, 2013).

Uma vez que a LOX atua sobre a matriz extracelular, ela pode desempenhar um importante papel na facilitação das interações entre o estroma e as células tumorais que podem ser fundamentais para determinar a capacidade de invasão e formação de metástases (SION; FIGG, 2006; XIAO; GE, 2012). Diversos mecanismos já foram descritos. Por exemplo, em modelo de câncer de mama murino, foi mostrado que a LOX derivada do tumor promove metástase pelo recrutamento de células provenientes na medula óssea para formar um “nicho pré-metastático”, o qual facilita a deposição e proliferação das células tumorais no sítio metastático (ERLER et al., 2009). Em outro trabalho, foi demonstrado que a LOX pode também agir estabilizando um regulador da transição epitélio-mesenquimal (PEINADO et al., 2005).

Adicionalmente, amostras clínicas apresentam correlações estatisticamente significativas entre a expressão da LOX e progressão de tumores de mama, cabeça e pescoço, próstata e rim (ERLER; GIACCIA, 2006; LAPOINTE et al., 2004). Altos níveis de RNA mensageiro e/ou da proteína puderam ser relacionados a um pior prognóstico da doença, representado por um aumento das taxas de recidiva e menor sobrevida global (SIDDIKUZZAMAN; GRACE; GURUVAYOORAPPAN, 2011).

Apesar de ser bastante estudada nas células tumorais, pouco se sabe sobre a expressão de LOX nos componentes do estroma tumoral. Em um dos trabalhos com esse propósito, Osawa et al., 2013 relataram a superexpressão da LOX em células endoteliais derivadas do tumor em comparação às de tecidos normais. Foi demonstrado que além de aumentar a motilidade dessas células, a LOX contribui para um fenótipo pró-angiogênico e promove a formação de vasos. Por outro lado, sua inibição reduziu a migração dessas células, diminuiu a angiogênese tumoral e resultou em uma menor formação de metástases pulmonares.

Portanto, os efeitos pró-tumorigênicos da enzima LOX podem ocorrer diretamente, por alterações da expressão e atividade nas próprias células tumorais, ou de forma indireta, agindo nas células do estroma ou mesmo pelo remodelamento da matriz extracelular.

Até o momento, não há na literatura estudos sobre expressão e função de proteínas da família LOX em pericitos. Considerando-se a associação entre expressão de LOX e progressão tumoral e os aspectos pró-tumorigênicos de pericitos, a hipótese do presente estudo é a de que pericitos expressam proteínas da família LOX e que essa expressão é relevante para a ativação de pericitos, com efeitos sobre suas propriedades relevantes às suas funções no microambiente tumoral.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência da família de enzimas lisil oxidase sobre as propriedades pró-tumorigênicas de pericitos.

Os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar pericitos derivados de tecido humano normal e de tumores do sistema nervoso.
2. Verificar o perfil de expressão de genes codificadores de enzimas da família LOX em pericitos.
3. Avaliar *in vitro* os efeitos do inibidor da atividade de enzimas da família LOX, β APN, sobre propriedades de migração, proliferação e atividade angiogênica de pericitos.

Materiais e Métodos

1. Culturas de células

As culturas primárias de pericitos A16 e A24 (isoladas a partir de tecido adiposo) e M19 e M24 (isoladas de tecido muscular) foram obtidas do Biobanco do Centro de Pesquisas do Genoma Humano. Tais culturas foram originalmente estabelecidas pelo grupo da Dra. Mayana Zatz, por procedimento descrito em Valadares *et al.*, 2014. Pericitos foram selecionados por citometria de fluxo (FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*) de acordo com o perfil de marcadores CD146+/CD34-/ CD45-/CD56-. No presente trabalho, essas culturas celulares foram mantidas em meio EBM-2 (*Endothelial Cell Growth Basal Medium, Lonza*), a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

As culturas primárias de pericitos PNMM e TP21 foram isoladas a partir de tumores primários de neuroblastoma e ependimoma, respectivamente, em colaboração com o Dr. Hamilton Matushita do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras foram obtidas em cirurgias de ressecção tumoral, mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP (CAAE: 46293315.0.0000.5464). Após a coleta e processamento, as células também foram mantidas em meio EBM-2 a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

As culturas primárias de células-tronco mesenquimais (CTMs), A24F, PLA3, M10 e UC3, foram também obtidas do Biobanco do Centro de Pesquisas do Genoma Humano. Tais culturas foram originalmente estabelecidas pelo grupo da Dra. Mayana Zatz, por procedimento descrito em Vieira *et al.*, 2012. Essas células foram devidamente caracterizadas quanto ao perfil de expressão de marcadores e potencial de

diferenciação *in vitro*, seguindo-se os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapias de Células-tronco (DOMINICI et al., 2006). O cultivo foi realizado em meio DMEM “*Low Glucose*” (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de solução de 100µg/mL Penicilina/100 µg/mL Estreptomicina (Gibco), a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

A linhagem comercial de células endoteliais provenientes de veia de cordão umbilical (HUVEC, ATCC) foi cultivadas em meio EBM-2 a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

A Tabela 1 a seguir resume as principais características das culturas celulares utilizadas no presente estudo.

Tabela 1: Culturas celulares utilizadas no estudo, seus respectivos tecidos de origem e método de seleção.

	Nomenclatura	Tecido de Origem	Seleção
Pericitos	A24	Tecido Adiposo	FACS
	A16	Tecido Adiposo	FACS
	M19	Tecido Muscular	FACS
	M24	Tecido Muscular	FACS
	PNMM	Tumor primário de neuroblastoma	Meio de cultivo específico
	P21	Tumor primário de ependimoma	Meio de cultivo específico
Células-tronco mesenquimais	A24F	Tecido Adiposo	Aderência em frasco de cultura e meio de cultivo
	PLAJ3	Tecido Adiposo	Aderência em frasco de cultura e meio de cultivo
	M10	Tecido Adiposo	Aderência em frasco de cultura e meio de cultivo
	UC3	Cordão Umbilical	Aderência em frasco de cultura e meio de cultivo
Célula Endotelial	HUVEC	Veia de cordão umbilical	Linhagem Comercial

2. Caracterização das linhagens de pericitos

2.1. Citometria de fluxo

As células foram lavadas com PBS (Gibco) e tratadas com Tryple Select (Gibco) por 2-5 minutos a 37°C para, então, serem contabilizadas. Foram separadas 10^5 células por anticorpo testado. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS e incubadas separadamente com um dos seguintes anticorpos comerciais durante 40 minutos a 4°C: anti-CD146-APC (R&D Systems, 1:50); anti-NG2-PE (R&D Systems, 1:50); anti-PDGFR β -PE (R&D Systems, 1:50); anti-CD31-FITC (BioLegend, 1:50); anti-CD45-APC (BioLegend, 1:50); anti-CD105 – FITC (BioLegend, 1:50); anti-CD90-PE (BD Biosciences, 1:50); anti-CD73-PE (BioLegend, 1:50).

Passado este tempo, foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e os precipitados celulares ressuspensos em PBS e analisados no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 5HTM Flow Cytometer* (Millipore – Guava technologies) com auxílio do software GuavaSoft 2.1.

2.2. Ensaios de formação de vasos *in vitro*

A atividade angiogênica de pericitos foi verificada *in vitro* pela metodologia descrita por BIRBRAIR et al., 2014. Em placa de 96 poços foram adicionados 50 μ L/poço de Matrigel (Corning cat#356234). Em seguida, a placa foi mantida a 37°C por, pelo menos, 30 minutos para que o Matrigel solidificasse. Então, foram adicionadas 2×10^4 células em cada poço, diluídas em 100 μ L de meio EBM-2 (Lonza, cat#CC-3156). A

incubação foi realizada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e os vasos sanguíneos puderam ser observados a partir de 2 horas.

3. Avaliação da expressão gênica da família LOX

3.1. Quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real

RNA total foi extraído utilizando o *kit Rneasy Plus Universal* (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada por espectrofotometria a 260 nm. A qualidade do RNA foi verificada pela razão de DO (Densidade Óptica) 260 nm/280 nm (idealmente entre 1.7 e 2.0) e por eletroforese em gel de agarose. Os experimentos utilizaram 1µg de RNA total de cada amostra para a síntese de cDNA com a enzima *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad/CA). O cDNA foi utilizado nas reações subsequentes de PCR, monitoradas pelo método de incorporação de *Sybr Green* (*kit Quantitect Sybr Green*, Qiagen Inc., Hilden, Alemanha). Os *primers* estão localizados em éxons distintos, para evitar eventuais amplificações oriundas de DNA contaminante e suas sequências estão dispostas na Tabela 2. A especificidade da reação foi confirmada através da análise da curva de dissociação dos produtos. A expressão de um gene-alvo específico foi normalizada pela expressão de genes constitutivos (TBP e β -actina).

Tabela 2: Sequência de DNA de primers para detecção de transcritos codificadores de proteínas da família LOX.

Primer		Sequência (5'-3')
<i>TBP</i>	Forward	GAG CTG TGA TGT GAA GTT TCC
	Reverse	TCT GGG TTT GAT CAT TCT GTA G
<i>β-actina</i>	Forward	CAC AGA GCC TCG CCT TTG C
	Reverse	TTC TGA CCC ATG CCC ACC A
<i>LOX</i>	Forward	AAG AGT GAA AAA CCA AGG GAC
	Reverse	A TGG TAG CCA TAG TCA CAG GAT G
<i>LOXL1</i>	Forward	TGG TAG CCA TAG TCA CAG GAT
	Reverse	G AAG AGT GAA AAA CCA AGG GAC A
<i>LOXL2</i>	Forward	TCG AGG TTG CAG AAT CCG ATT
	Reverse	TTC CGT CTC TTC GCT GAA GGA
<i>LOXL3</i>	Forward	CGG ATG TGA AGC CAG GAA ACT
	Reverse	AGG CAT CAC CAA TGT GGC A
<i>LOXL4</i>	Forward	GGC AGA GTC AGA TTT CTC CAA
	Reverse	CA GAG TTC TGC ATT GGC TGG GTA T

4. Avaliação das propriedades dos pericitos *in vitro* após bloqueio da atividade da LOX

A fim de bloquear a atividade da família de enzimas LOX e determinar seus efeitos nas propriedades dos pericitos, as células foram tratadas previamente aos ensaios com 1 μ M do composto β APN (*β -aminopropionitrile*). Trata-se um bloqueador

irreversível de enzimas da família LOX, que se liga da região catalítica destas proteínas, inibindo sua atividade (YANG et al., 2013). Como a família de enzimas LOX possuem tal região conservada, todos os membros são inespecificamente bloqueados.

4.1. Ensaio de viabilidade celular

As células viáveis foram estimadas pelo método do MTT (Metil-tiazol tetrazólio). A redução desse sal, de coloração amarela e solúvel em água, acontece pela ação direta da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, em um produto de coloração azul e solúvel em DMSO (dimetilsulfóxido), o cristal formazan. As células foram previamente tratadas por 24, 48 e 96 horas com β APN a 1mM e, em seguida, incubadas com o MTT a concentração de 166,67 μ g/mL durante 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Passado este período, a solução de MTT foi descartada e o cristal de formazan dissolvido em 500 μ L de DMSO. A quantificação do metabolismo de MTT foi realizada em triplicata através de leitura espectrofotométrica a 550 nm.

4.2. Ensaio de migração

A migração das células foi avaliada pelo método modificado de Boyden, em câmaras de migração compostas por uma membrana de policarbonato contendo poros de 8 μ m (*Transwell, Costar*). As membranas foram colocadas no aparato de migração de forma a separar o compartimento inferior do superior. As células foram colocadas no compartimento superior (10⁵/poço) e, no compartimento inferior, foi adicionado meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (SFB), que age como quimioatraente para migração. Então, foi realizada a incubação a 37°C com 5% de CO₂ por 12h, no caso dos pericitos de tecido normal, e por 3h para os pericitos de origem tumoral. Após este período, a

membrana foi lavada em PBS, fixada com uma solução de formaldeído 3,7% em PBS e corada com solução de azul de toluidina 1% em borax 1%. As células que não migraram e permaneceram no compartimento superior foram retiradas fisicamente com auxílio de haste flexível. Em seguida, a membrana foi incubada em SDS 1% em PBS a fim de diluir o corante das células que migraram para o compartimento inferior. A leitura da absorbância foi realizada em triplicata a 626nm.

Previamente ao ensaio, as células do grupo “ β APN” foram incubadas durante 12 horas com este composto a 1mM. Além disso, o mesmo foi adicionado ao meio no qual as células foram diluídas para o plaqueamento.

4.3. Ensaio de proliferação celular

A detecção de células em proliferação foi realizada pela incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU. Este composto é um derivado do nucleosídeo Uridina e possui estrutura análoga à Timidina. Assim, durante a fase de síntese (fase S) do DNA, pode ser incorporado como um substituto da Timidina, funcionando como um marcador de replicação. Sua detecção será realizada por fluorescência, utilizando anticorpo anti-BrdU e um anticorpo secundário conjugado com um fluorocromo. Por fim, é realizada a marcação nuclear com DAPI e observação das amostras em um microscópio de fluorescência.

Para tanto, as células foram semeadas em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas de vidro (12 x 0,11 mm). Após o pré-tratamento de 24 horas e 48 horas com β APN, as células foram incubadas com o composto BrdU 10 μ M durante duas horas a 37°C. Passado este período, as células foram fixadas com uma solução de formaldeído a 3,7% em PBS durante 15 minutos. Então, seguiu-se com duas lavagens com 3% BSA em

PBS e incubou-se por 20 minutos com 0,5% Triton® X-100. Após novas lavagens, as células foram mantidas por 30 minutos no escuro com solução de anticorpo marcado por fluorescência de acordo com o protocolo do fabricante. Por fim, foi adicionado DAPI (1:10.000) por dois minutos e as lamínulas foram rearranjadas em lâminas para posterior visualização ao microscópio de fluorescência.

4.4. Dinâmica de formação de vasos *in vitro* (Time-lapse)

O ensaio foi realizado como descrito na seção 1.2. e as imagens foram capturadas em intervalos de 30 minutos durante 24 horas utilizando-se o aparelho *InCell Analyzer 2200* (*GE Healthcare Life Sciences*). Em seguida, as imagens foram analisadas e os lúmens (considerados como regiões internas circundadas pelos cordões celulares) formados foram contabilizados como auxílio do software *ImageJ*.

5. Forma de análise dos resultados

Os dados foram expressos como média \pm EPM. Comparações entre grupos experimentais foram feitas por análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância $P < 0,05$ foi adotado para todos os experimentos.

Resultados

1. Caracterização das linhagens de pericitos

As linhagens de pericitos utilizadas no estudo foram caracterizadas quanto ao perfil de expressão de marcadores de superfície celular usualmente aplicados para identificação dessas células (CD146, NG2, PDGFR- β) e por marcadores típicos de células endoteliais, hematopoiéticas e mesenquimais (CD31, CD45, CD105, CD90, CD73). Adicionalmente, foi realizada a caracterização funcional das linhagens por meio da formação de vasos *in vitro*, propriedade distintiva de pericitos e células endoteliais.

1.1. Citometria de fluxo

Os pericitos não possuem marcadores exclusivos que os identificam. Entretanto, alguns marcadores como CD146, NG2 e PDGFR- β são geralmente utilizados na literatura para identificar e isolar essas células. Sendo assim, construiu-se um painel de oito marcadores de superfície celular a fim de caracterizar as populações celulares do estudo, incluindo marcadores típicos de pericitos, células endoteliais, hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. As figuras 3 a 6 mostram a expressão desses marcadores nas diferentes culturas de pericitos, analisadas por citometria de fluxo. Estes resultados estão reunidos na Tabela 4.

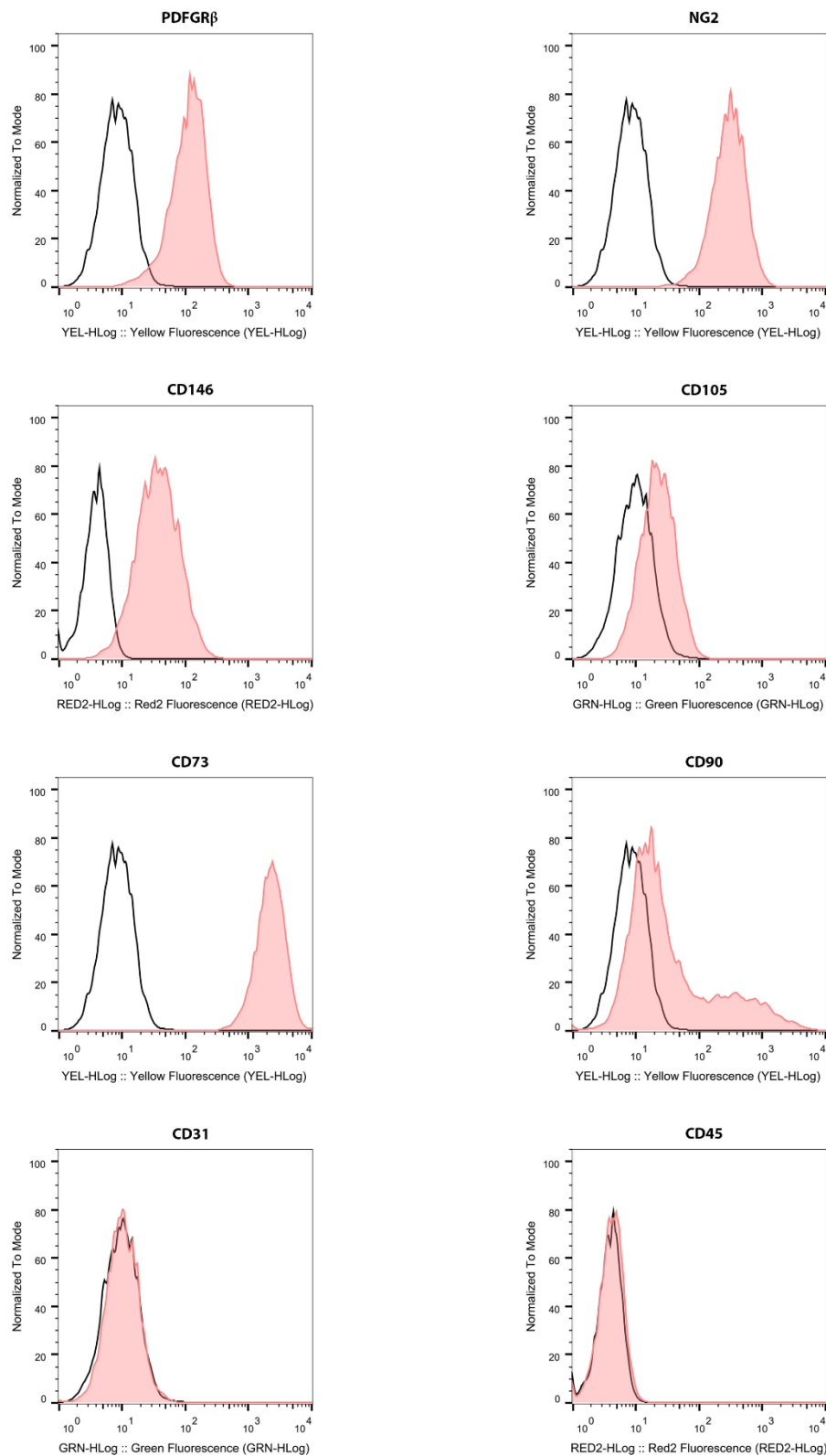


Figura 3. Caracterização de marcadores por citometria de fluxo dos pericitos A16. O controle (linha preta) corresponde às células sem marcação. Os gráficos foram gerados após análise no programa *FlowJo* do ensaio de marcação por citometria de fluxo.

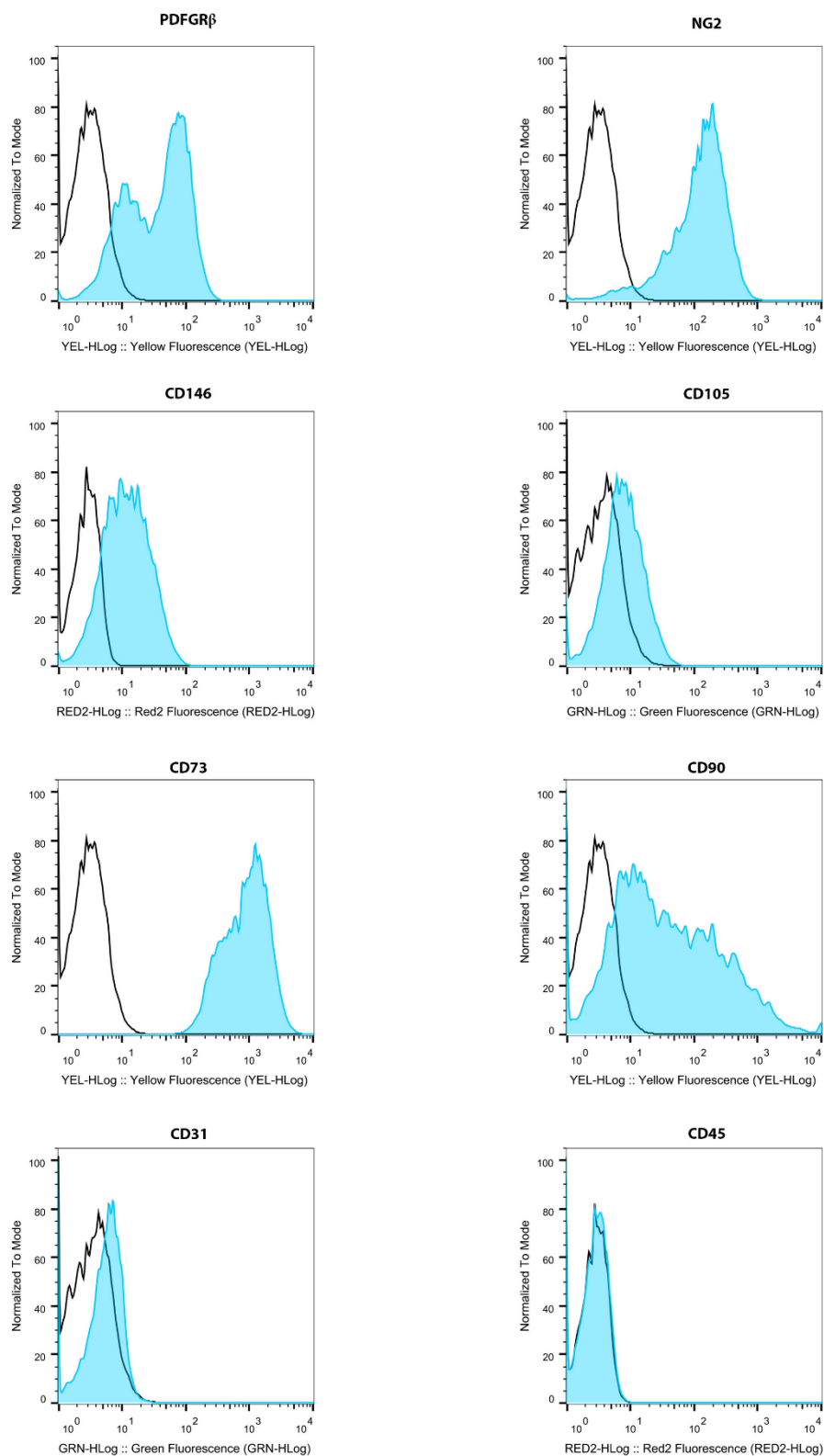


Figura 4. Caracterização de marcadores por citometria de fluxo dos pericitos M19. O controle (linha preta) corresponde à célula sem marcação. Os gráficos foram gerados após análise no programa *FlowJo* do ensaio de marcação por citometria de fluxo.

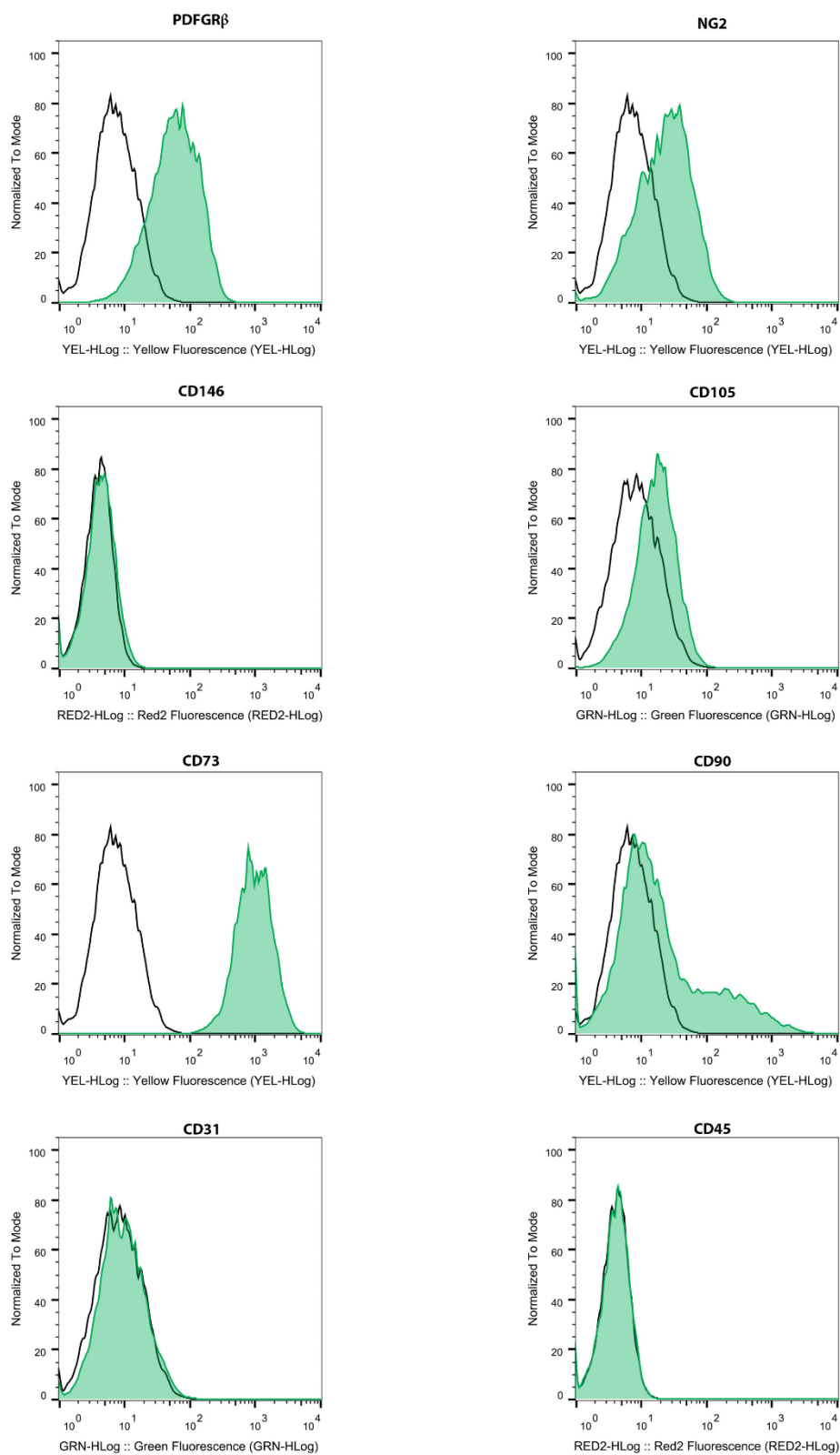


Figura 5. Caracterização de marcadores por citometria de fluxo dos pericitos PNMM. O controle (linha preta) corresponde à célula sem marcação. Os gráficos foram gerados após análise no programa *FlowJo* do ensaio de marcação por citometria de fluxo.

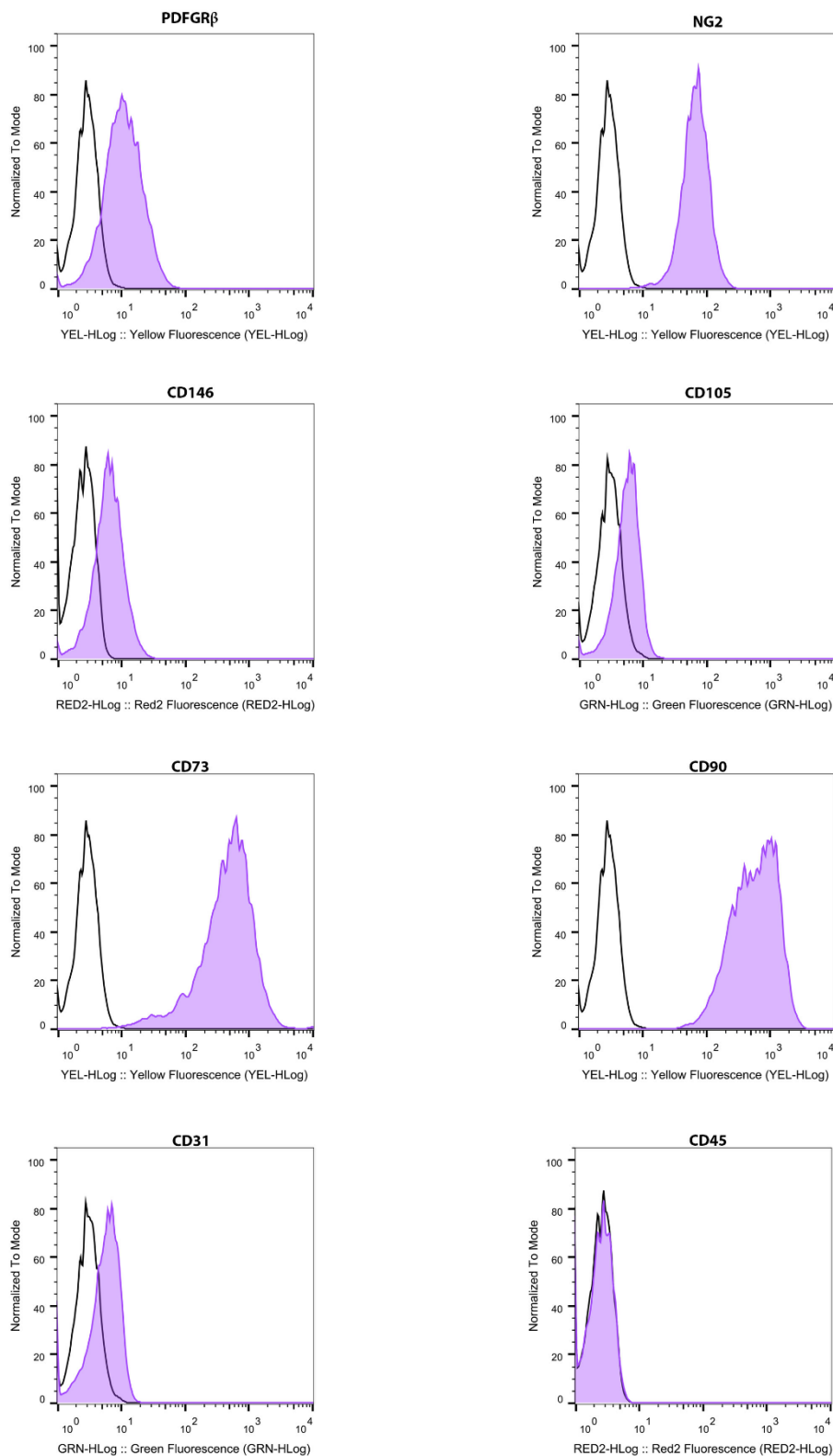


Figura 6. Caracterização de marcadores por citometria de fluxo dos pericitos P21. O controle (linha preta) corresponde à célula sem marcação. Os gráficos foram gerados após análise no programa *FlowJo* do ensaio de marcação por citometria de fluxo.

Tabela 3: Porcentagem de células positivas quanto à expressão de marcadores proteicos em culturas de pericitos derivados de tecidos não-tumorais (A16 e M19) e tumorais (PNMM e P21).

		A16	M19	PNMM	P21
Marcadores de pericitos	CD146	95,0	65,5	0,4	46,4
	NG2	99,4	94,1	22,7	99,6
	PDGFR β	93,1	70,3	63,0	59,6
Marcadores de células endoteliais/ hematopoiéticas	CD31	0,3	0,8	1,0	10,2
	CD45	0,8	0,2	0,1	0,1
Marcadores de células-tronco mesenquimais	CD105	5,0	11,7	2,2	7,2
	CD90	34,1	60,6	24,6	99,7
	CD73	100,0	100,0	100,0	100,0

Os pericitos provenientes de tecido não-tumorais, A16 e M19, apresentaram alta expressão dos marcadores de pericitos (CD146, NG2 e PDGFR β), ausência de marcadores endoteliais e nenhuma mostrou expressão positiva para todos os marcadores de células-tronco mesenquimais testados (>90%). Quanto aos pericitos derivados de tecido tumoral, observou-se maior variação de expressão dos marcadores comparando-se as duas populações. Assim, pode-se excluir a possibilidade de se tratar de células endoteliais ou hematopoiéticas, e sabe-se que os pericitos de diversos tecidos compartilham marcadores com células-tronco mesenquimais. Neste caso, 100% das células testadas expressam CD73 (Tabela 3).

1.2. Ensaios de formação de vasos *in vitro*

O ensaio de formação de vasos *in vitro* foi realizado, inicialmente, para testar se os pericitos seriam capazes de formar vasos nas condições testadas, uma vez que poucos trabalhos na literatura relatam a capacidade dessas células de formarem essas estruturas na ausência de células endoteliais. Para tanto, células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano (HUVEC) foram consideradas controle positivo do ensaio, pois já está bem descrito que formam vasos utilizando tal protocolo; ao contrário, as células tronco mesenquimais (CTMs) foram utilizadas como controle negativo, uma vez que não possuem propriedades angiogênicas. Para esse experimento, foi escolhida de pericitos pareados com CTMs, isto é, derivadas do mesmo tecido e paciente (pericitos, A24; e CTMs, A24F).

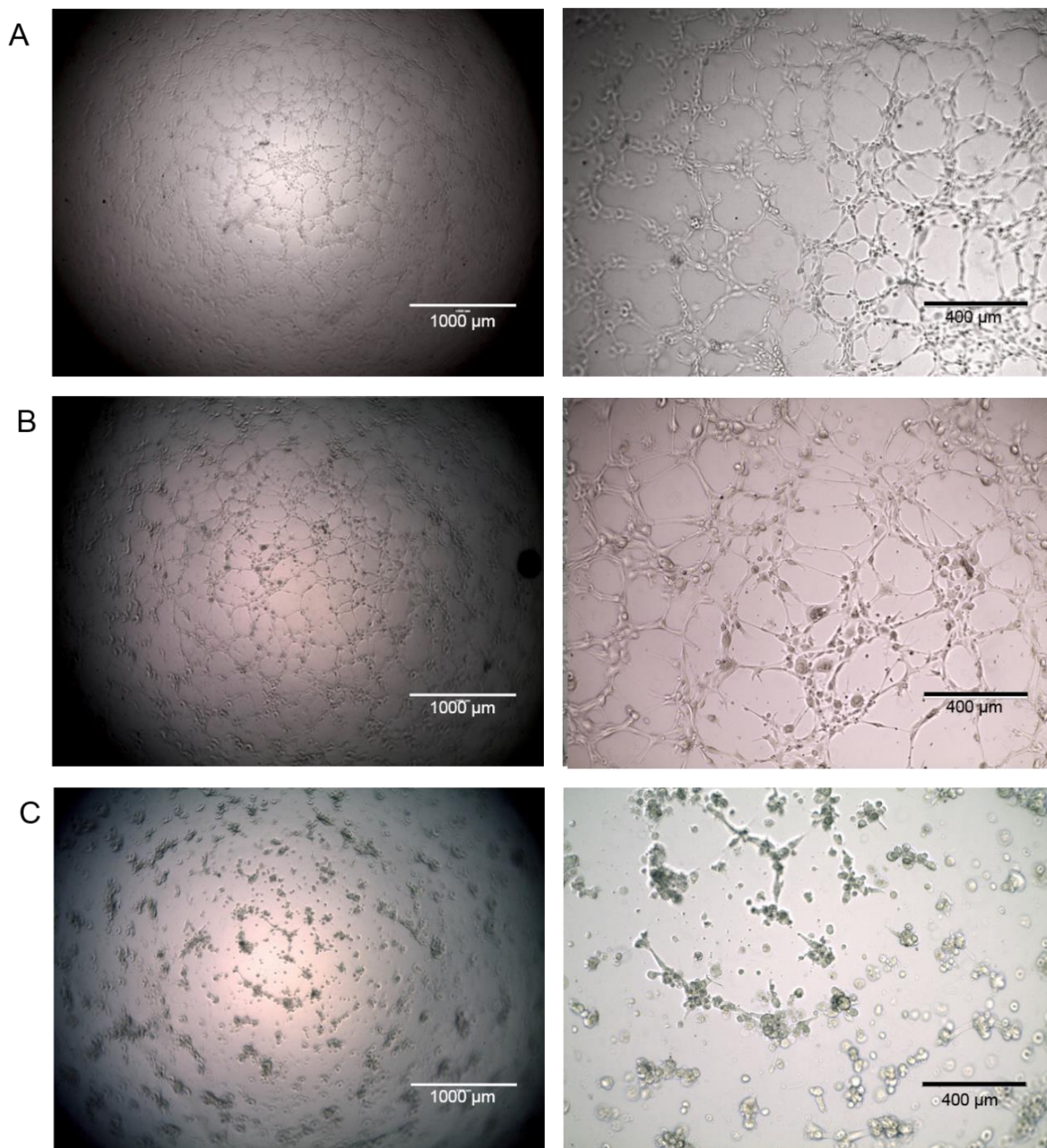


Figura 7. Formação de vasos após 2 horas de ensaio, sendo (A) HUVEC; (B) Pericitos (A24); (C) CTMs (A24F).

Na figura 7, podemos observar que as células HUVECs e os pericitos apresentaram a habilidade de formar estruturas de cordões celulares que se arranjam de maneira semelhantes aos vasos (Figuras 7a e 7b), enquanto que as CTMs não possuem esse potencial e formam apenas agregados celulares (Figura 7c).

Uma vez que os pericitos são células bastante heterogêneas quanto ao perfil de expressão de marcadores, como demonstrado na seção anterior, fez-se necessária uma caracterização complementar funcional que demonstrasse a propriedade típica dessas células, a formação de vasos *in vitro*. Como essa habilidade não é comum a outros tipos celulares, como as células-tronco mesenquimais, ela foi importante na constatação de que as linhagens utilizadas se tratavam de pericitos. Assim, ao serem testadas para essa finalidade, todas as linhagens utilizadas no estudo demonstraram propriedade angiogênica (Figura 8).

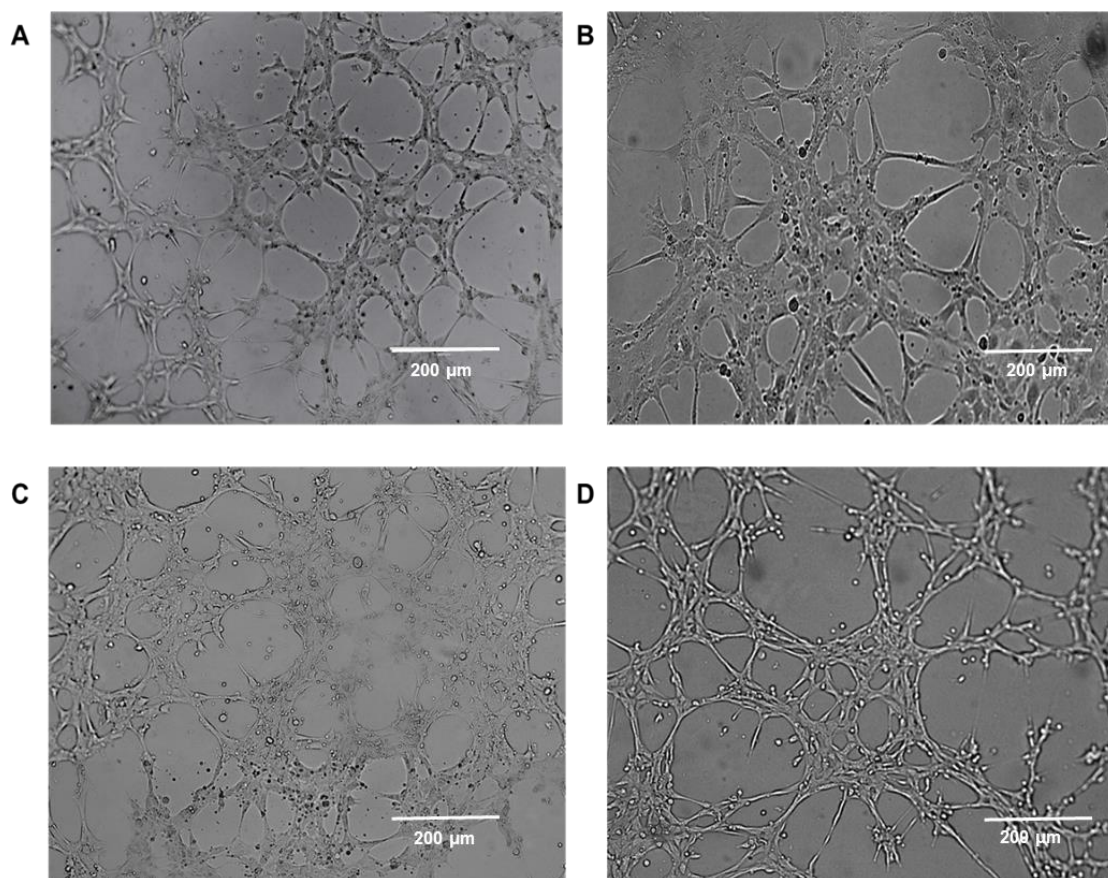


Figura 8. Formação de vasos *in vitro* das culturas de pericitos utilizadas no estudo: (A) Pericitos derivados de tecido normal A16; (B) Pericitos derivados de tecido normal M19; (C) Pericitos derivados de tecido tumoral PNMM; (D) Pericitos derivadas de tecido tumoral P21.

2. Análise da expressão de genes codificadores de enzimas da família LOX em pericitos

Até o presente momento, não haviam dados na literatura a respeito da expressão de membros da família LOX de proteínas em pericitos. Sendo assim, o nível de expressão de genes codificadores dessas enzimas foi analisado em três culturas de pericitos provenientes de tecido normal: A16, proveniente de tecido adiposo; M19 e M24, derivadas de tecido muscular. Adicionalmente, foram analisadas duas culturas de pericitos isolados de tumores primários: PNMM, provenientes de neuroblastoma; e P21, de ependimoma.

A fim de comparar a expressão desses genes em pericitos e outros tipos celulares, foram escolhidas: (1) duas culturas de CTMs (PLAJ3, isolada de tecido adiposo; e M10, de medula óssea), principalmente, devido às propriedades compartilhadas por essas células, como multipotencialidade e expressão de marcadores em comum; e (2) uma linhagem de célula endotelial (HUVEC), uma vez que são os principais componentes dos vasos sanguíneos, juntamente com os pericitos. Todas as culturas celulares são de origem humana.

Os dados aqui apresentados utilizam como curva padrão a expressão das proteínas da família LOX nas culturas de CTMs UC3, uma vez que dados prévios gerados em nosso laboratório mostraram a expressão e o silenciamento efetivo de *LOX* nestas células (dados não publicados).

A Figura 9 apresenta as comparações da expressão de genes da família *LOX* para cada uma das culturas de células utilizadas no estudo. De maneira geral, pode-se observar que a expressão das enzimas varia significativamente para todos os tipos celulares. A expressão do gene codificador da enzima LOXL3 destacou-se em todas as culturas de

pericitos de tecido normal (A16, M19 e M24), assim como na cultura de pericito tumoral P21. Entretanto, na outra cultura de pericito tumoral, PNMM, o gene codificador da LOXL1 foi o que demonstrou ter os maiores níveis de expressão, comparativamente aos demais genes da mesma família. Esses mesmo perfil de expressão foi encontrado para as CTMs (PLAJ3 e M10). De todas as culturas testadas, as células HUVEC foram as que apresentaram os menores níveis de expressão de genes codificadores de enzimas da família LOX.

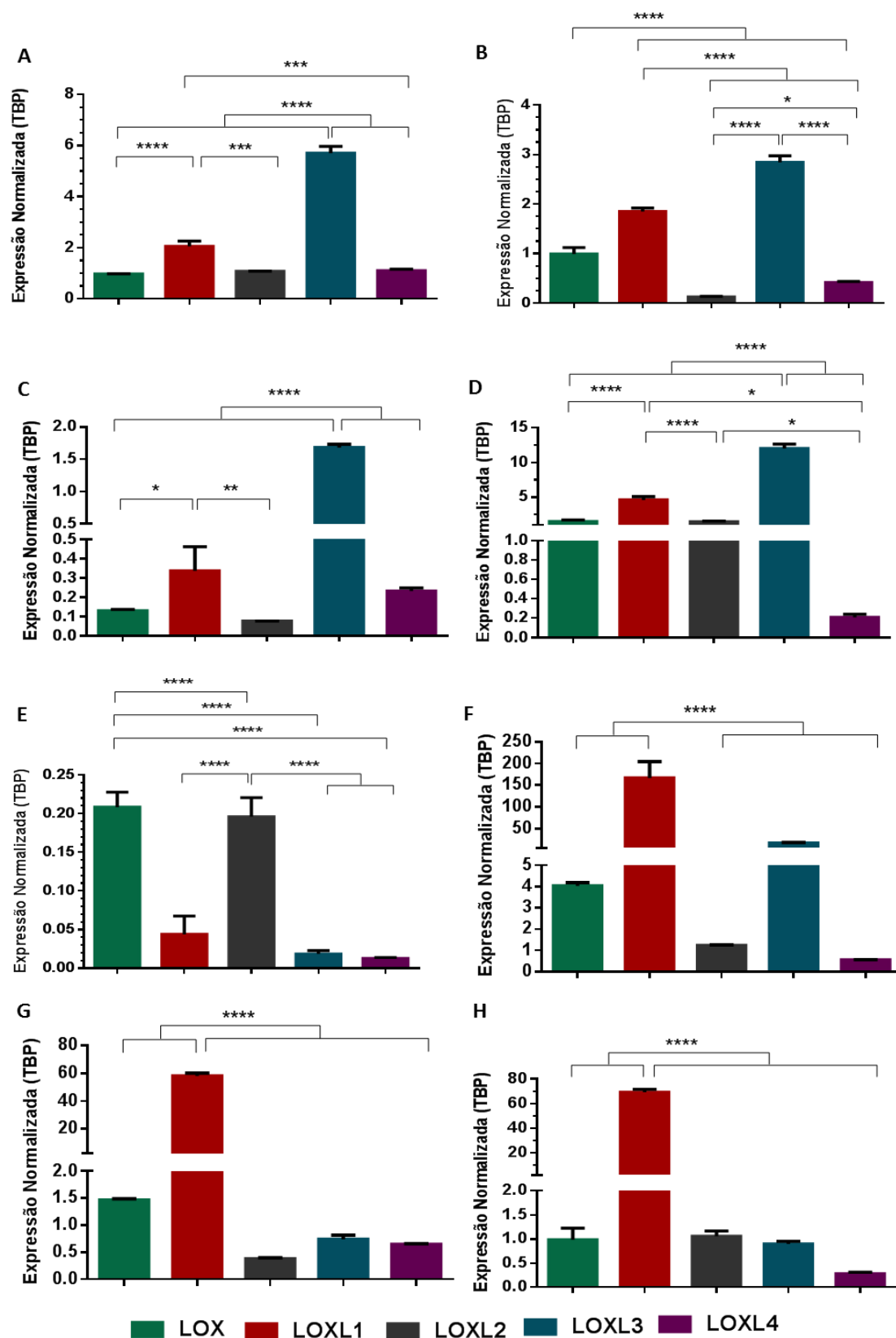


Figura 9. Expressão relativa de genes codificadores de enzimas da família LOX em diferentes tipos celulares: (A) A16; (B) M19; (C) M24; (D) P21 ;(E) PNMM; (F) M10; (G) PLA3; (H) HUVEC. Quantificação normalizada com o gene endógeno TBP. Análise estatística realizada comparando a expressão dos membros da família LOX de proteínas dentro de cada tipo celular. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

3. Avaliação das propriedades dos pericitos *in vitro* após bloqueio da atividade de enzimas da família LOX

3.1. Ensaio de viabilidade celular

A fim de determinar se o β APN, composto utilizado nos experimentos para bloquear a atividade de enzimas da família LOX, causa alterações na viabilidade das células, realizou-se tratamentos prévios das células com essa substância em concentração $1\mu\text{M}$ por 24, 48 e 72 horas e, então, mediu-se o metabolismo do composto MTT pelos pericitos para verificar a viabilidade destes.

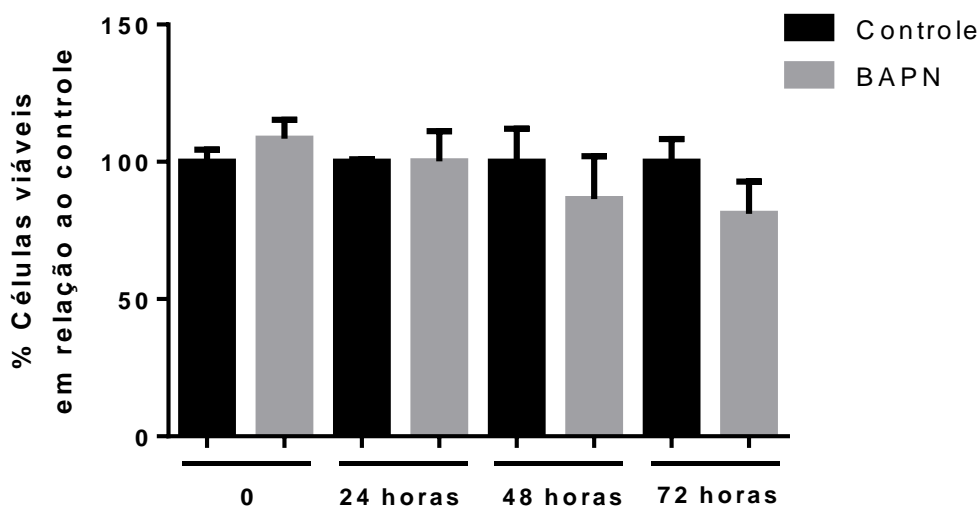


Figura 10. Metabolismo de MTT dos pericitos A16 após 24, 48 e 72 horas de pré-tratamento com β APN.

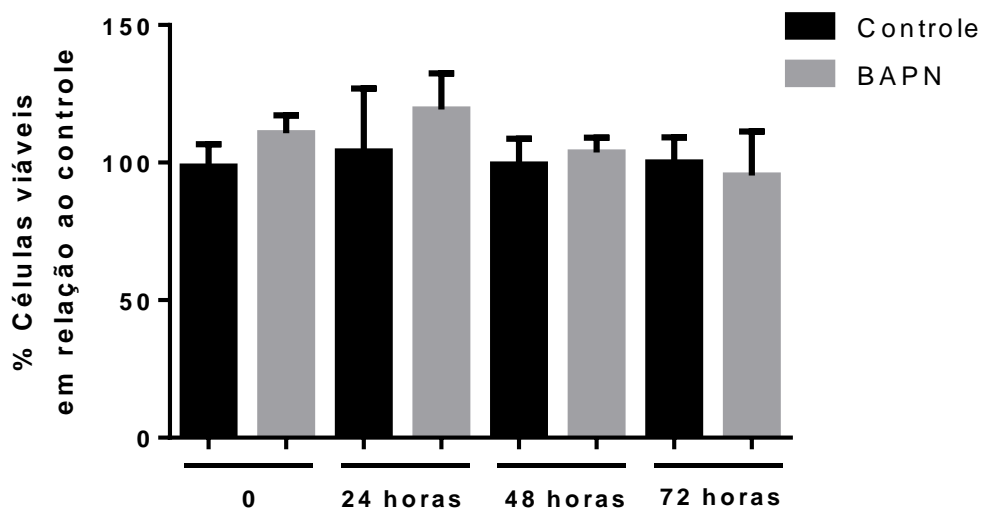


Figura 11. Metabolismo de MTT dos pericitos M19 após 24, 48 e 72 horas de pré-tratamento com β APN.

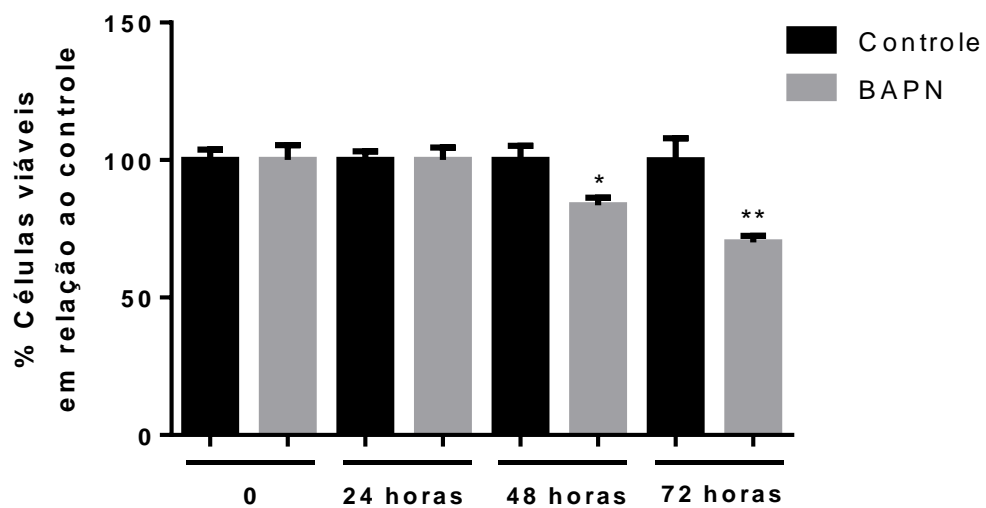


Figura 12. Metabolismo de MTT dos pericitos PNMM após 24, 48 e 72 horas de pré-tratamento com β APN.

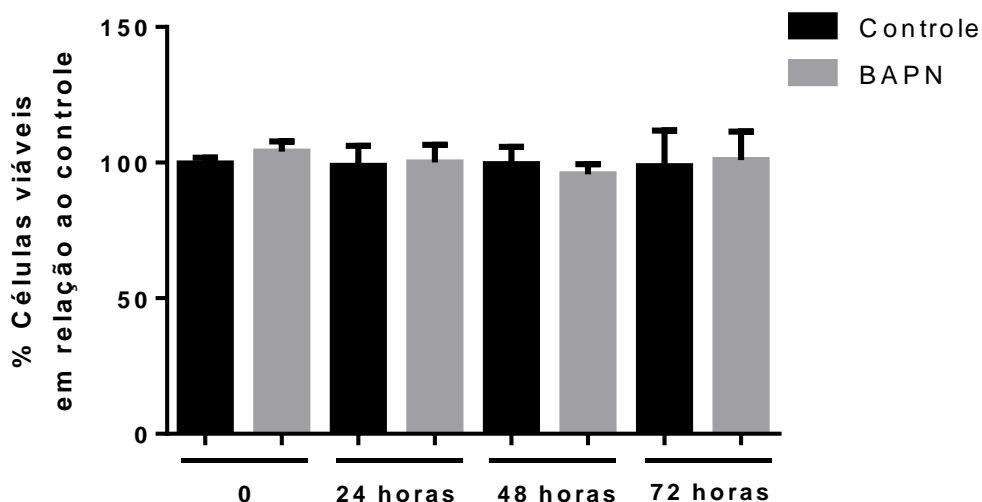


Figura 13. Metabolismo de MTT dos pericitos TP21 após 24, 48 e 72 horas de pré-tratamento com β APN.

Os resultados demonstram que não houve alterações estatisticamente significativas para as linhagens A16, M19 e TP21 no metabolismo de MTT entre o grupo controle e o tratado com β APN. Para os pericitos PNMM, observou-se uma redução do metabolismo de MTT apenas para os tratamentos de 48 e 72 horas com β APN (Figuras 10 a 13).

Assim, com o intuito de evitar efeitos decorrentes do β APN sobre a viabilidade celular, os experimentos realizados para avaliar as propriedades dos pericitos após o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX utilizaram tratamentos prévios com β APN de 24 horas apenas, uma vez que os dados mostraram que esta droga não afeta a viabilidade das células testadas durante este intervalo.

3.2. Ensaio de migração

Inicialmente, o ensaio de migração foi padronizado utilizando dos pericitos A24, proveniente de tecido adiposo. Foram testados três tempos, 6, 12 e 24 horas; além de dois quimioatraentes, meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sobrenadante coletado de células de glioblastoma (U87MG) após 24 horas de cultivo (Figura 14).

Os tempos de 12 e 24 horas foram mais adequados, uma vez que os controles positivos (tanto aqueles cultivados com meio de cultivo com 10% de SFB e aqueles cultivados com sobrenadante de U87MG) apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo. Além disso, pôde-se notar que o sobrenadante de U87MG foi um estímulo efetivo para a migração dos pericitos. O tempo de 12 horas foi escolhido devido à maior consistência nas repetições realizadas e por permitir que pudessem ser observadas diferenças de migração após o tratamento das células, pois não atingiram o máximo.

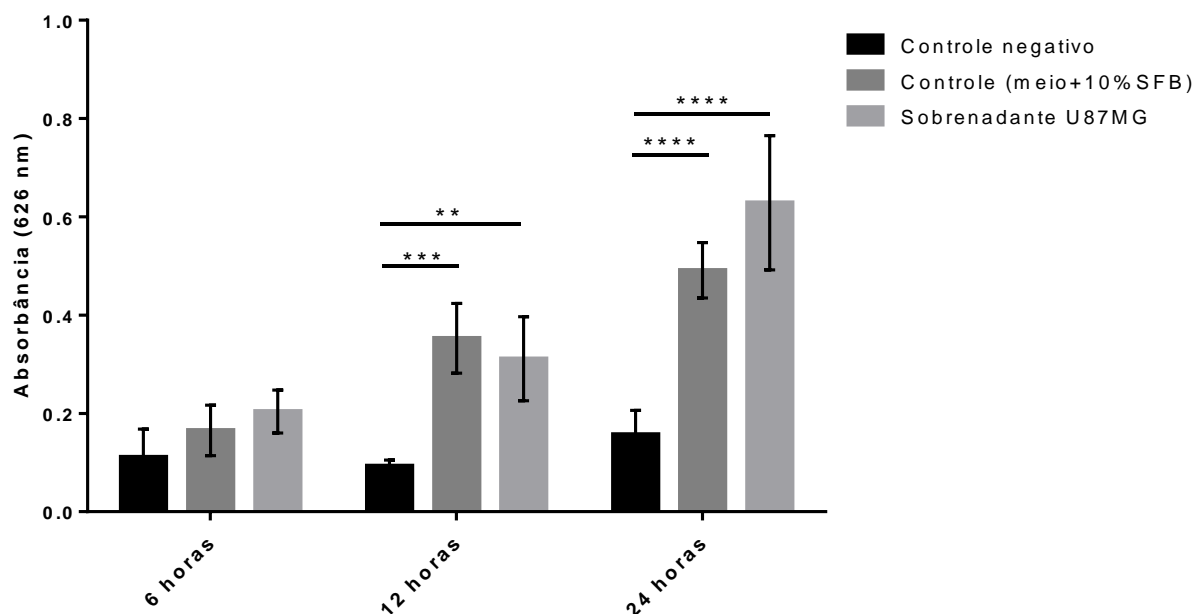


Figura 14. Padronização do ensaio de migração de pericitos derivados de tecido adiposo (A24). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Após a padronização, outras duas linhagens de pericitos provenientes de tecido normal (A16 e M19) foram submetidas ao ensaio de migração na ausência (grupo controle) e na presença do inibidor de enzimas LOX/LOXL (grupo β APN). Pôde-se observar que, em ambos os casos, houve inibição da migração das células após incubação com β APN, de forma que, apesar do estímulo fornecido (meio de cultivo com 10% de

SFB), a quantidade de células que migraram no grupo tratado foi semelhante à do grupo considerado como controle negativo. Portanto, o tratamento com β APN foi capaz de reverter a migração dos pericitos próximo aos níveis basais (Figura 15).

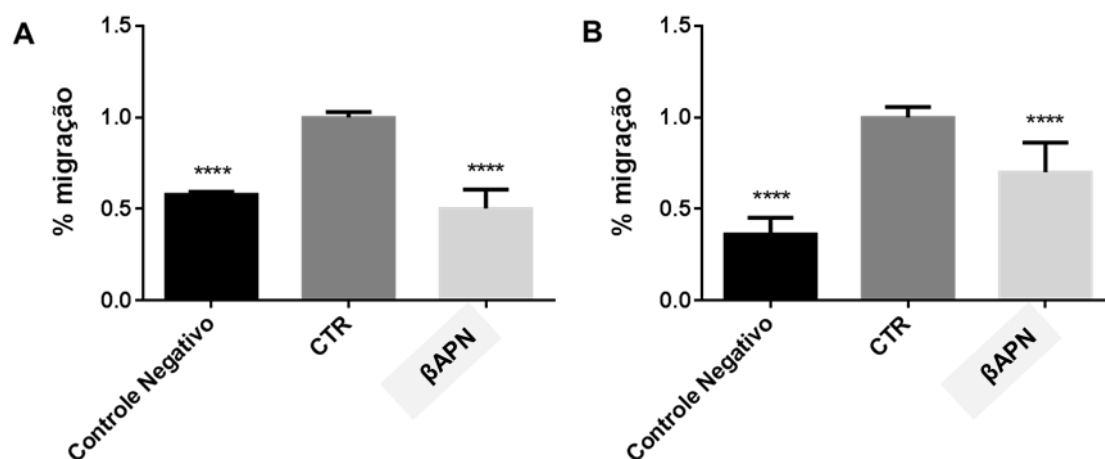


Figura 15. Ensaio de migração dos pericitos de (A) tecido adiposo (A16) e (B) tecido muscular (M19) durante 12 horas. **** $p < 0,0001$.

Além das linhagens de pericitos derivados de tecido normal, a migração da dos pericitos provenientes de tumor primário de neuroblastoma (PNMM) também foi padronizada. Notou-se que essas células apresentaram migração mais rápida do que a observada nos pericitos de tecido não tumoral. A absorbância indicou que mais células PNMM migraram durante 6 horas do que as linhagens A16 e M19 após 12 horas. Devido à menor sensibilidade do ensaio em absorbância acima de 1, foi padronizado um tempo menor, de 3 horas, para a migração dessas células (Figura 16). Os pericitos provenientes de tumor primário de ependimoma (P21) também mostram migração efetiva em 3 e 6 horas (Figuras 16 e 17).

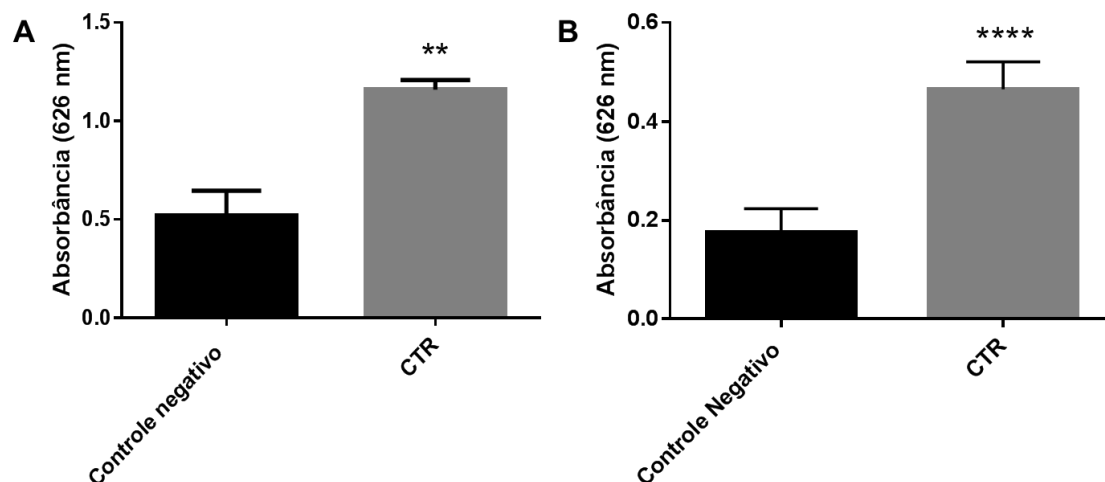


Figura 16. Padronização do ensaio de migração dos pericitos de (A) neuroblastoma (PNMM) e (B) ependimoma (P21) durante 6 horas. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

O tempo de 3 horas e o efeito do β APN sobre a migração dos pericitos de tumor foram, então, testados. Observou-se uma diferença significativa entre os controles negativo e positivo, além de uma diminuição da migração das células após incubação com β APN, efeito semelhante ao encontrado nas células de tecido não tumoral.

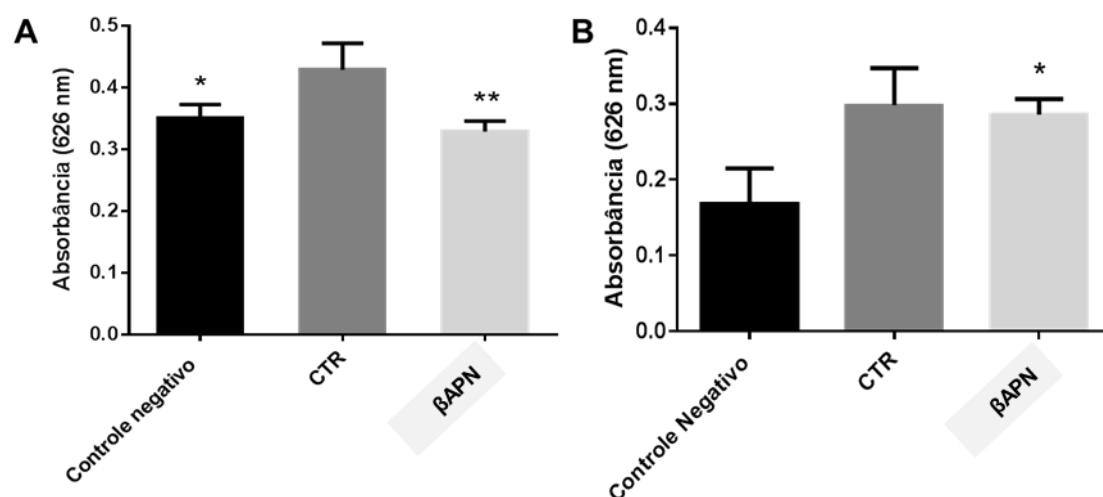


Figura 17. Ensaio de migração dos pericitos (A) neuroblastoma (PNMM) e (B) ependimoma (P21) durante 3 horas após pré-tratamento de 24 horas com β APN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Na figura 17, podemos observar um comportamento semelhante das linhagens derivadas de tecido tumoral em relação às linhagens de tecido normal, no qual, após o tratamento com β APN, houve uma diminuição da quantidade de células capazes de migrar com o estímulo quimioatraente. Entretanto, os efeitos na migração dos pericitos P21 foi menor, tendo uma diminuição estatisticamente significativa.

3.3. Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação foi realizado por meio do método de incorporação do composto BrdU. Podemos observar que nos tempos testados, 24 e 48 horas, o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX não afetou o número de células em divisão nas condições testadas em nenhuma das linhagens de pericitos (Figura 18).

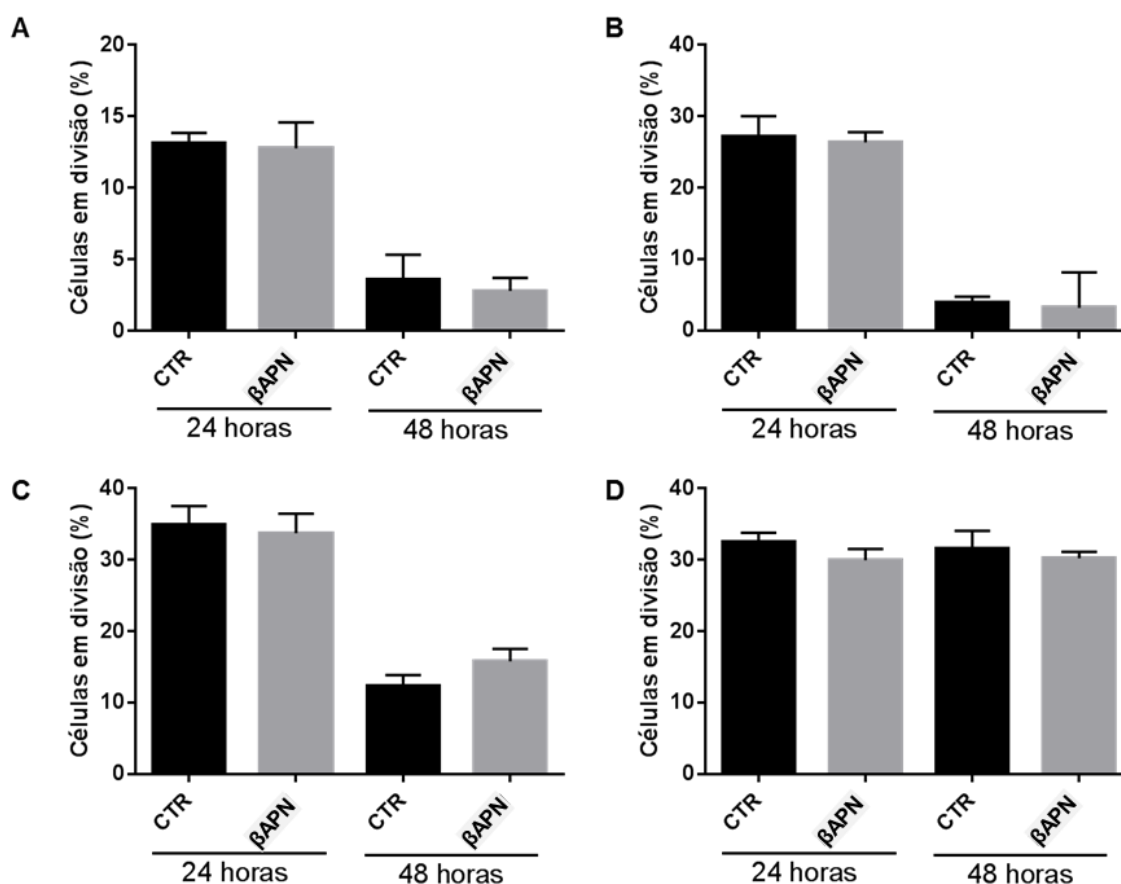


Figura 18. Ensaio de proliferação dos pericitos por incorporação de BrdU. (A) A16; (B) M19; (C) PNMM; e (D) P21; após pré-tratamento de 24 horas e 48 horas com β APN.

3.4. Dinâmica de formação de vasos *in vitro* (*Time-lapse*)

A fim de analisar possíveis alterações na dinâmica *in vitro* de formação de vasos sanguíneos dos pericitos após o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX, foi realizado o *time-lapse* gerando imagens a cada 30 minutos durante 24 horas dos pericitos testados (Figuras 19 a 22).

Os resultados mostram que o tratamento com o bloqueador da atividade de enzimas da família LOX, β APN, foi capaz de alterar a dinâmica de formação de vasos *in vitro* de todas as linhagens testadas. De maneira geral, o tratamento com β APN diminuiu o número máximo de lúmens formados, principalmente nos picos de formação (1 a 2 horas). As curvas também se mostraram deslocadas em relação ao controle, o que indica uma alteração do tempo levado para formar e desformar as estruturas.

Os pericitos A16 sofreu menores alterações em relação às demais linhagens devido ao tratamento com β APN. Pôde-se observar que os grupos alcançaram o pico de formação em tempos equivalentes, porém, menos estruturas foram formadas no grupo tratado. Já nos pericitos M19, ao contrário das demais, foram formados maior quantidade de lúmens, entretanto, o processo de formação durou menos tempo, deslocando a curva para a esquerda.

Os pericitos isolados de tumores primários também apresentam redução dos lúmens formados, sendo o efeito mais proeminente nos pericitos PNMM. A curva foi deslocada para a direita, mostrando que o processo de formação foi mais lento na presença do β APN.

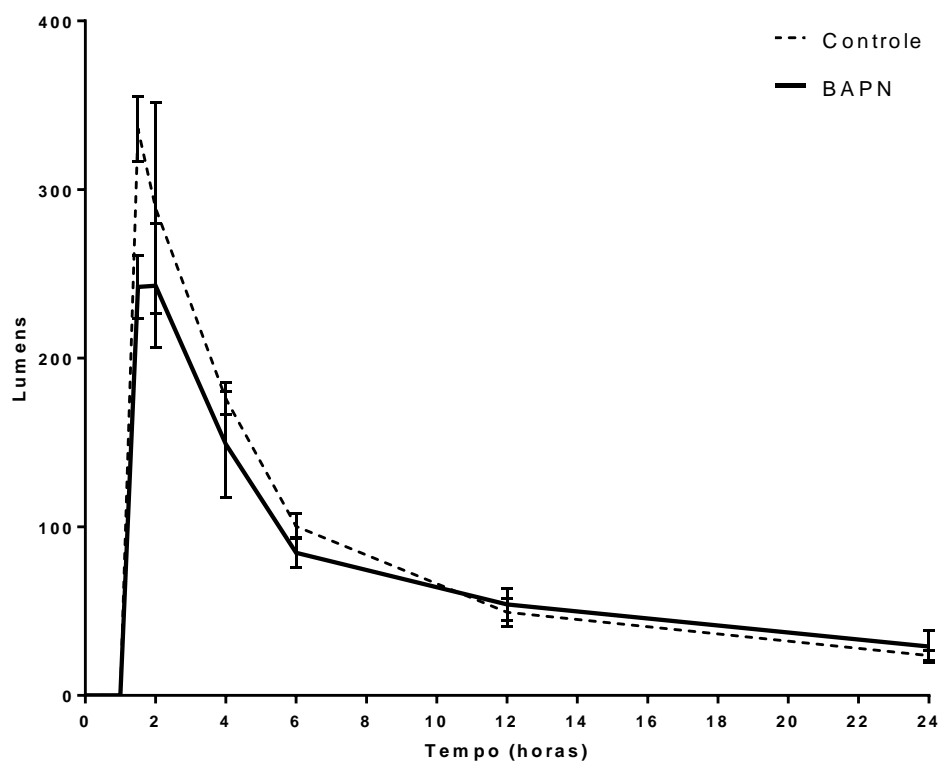


Figura 19. Curva representativa da dinâmica da formação de vasos dos pericitos A16 realizada por *Timelapse* com imagens geradas a cada 30 minutos comparando a atividade dos pericitos antes e após o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX.

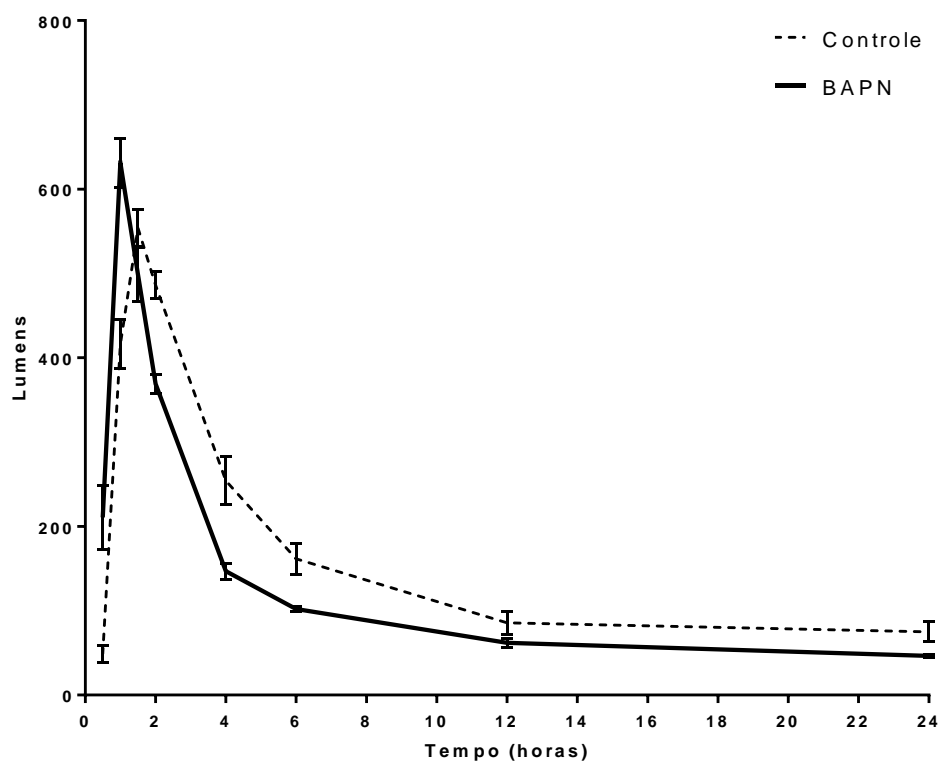


Figura 20. Curva representativa da dinâmica da formação de vasos dos pericitos M19 realizada por *Timelapse* com imagens geradas a cada 30 minutos comparando a atividade dos pericitos antes e após o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX.

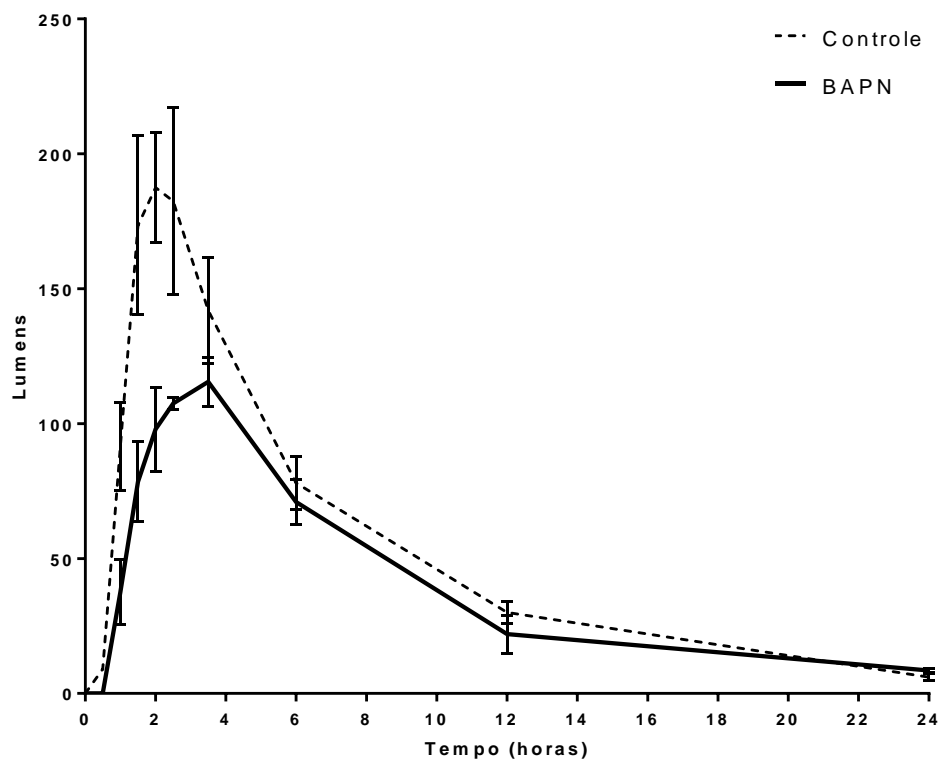


Figura 21. Curva representativa da dinâmica da formação de vasos dos pericitos PNMM realizada por *Timelapse* com imagens geradas a cada 30 minutos comparando a atividade dos pericitos antes e após o bloqueio atividade de enzimas da família LOX.

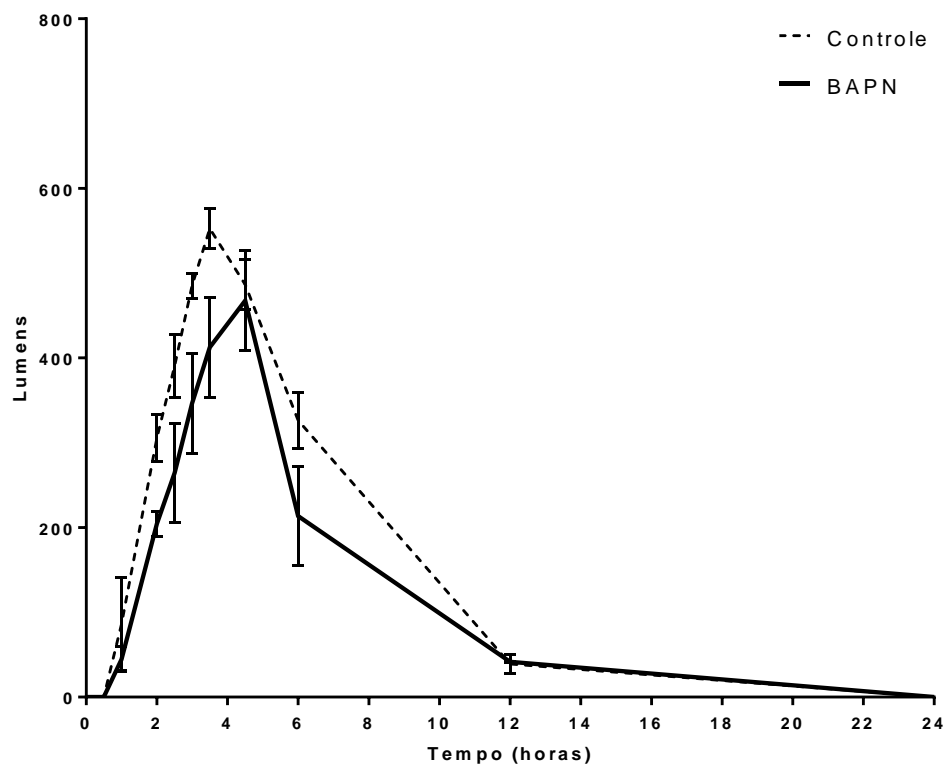


Figura 22. Curva representativa da dinâmica da formação de vasos dos pericitos P21 realizada por *Timelapse* com imagens geradas a cada 30 minutos comparando a atividade dos pericitos antes e após o bloqueio da atividade de enzimas da família LOX.

Discussão

A parte inicial do trabalho consistiu na caracterização dos pericitos selecionados para o estudo. Apesar de haver um crescente número de pesquisas apontando essas células como importantes componentes do microambiente tumoral, uma vez que são capazes de influenciar a progressão tumoral e o desfecho clínico da doença, pouco se sabe sobre suas propriedades e funções neste contexto.

Embora não haja um consenso na literatura sobre os critérios mínimos para definir os pericitos, usualmente, são utilizados aspectos morfológicos, origem e expressão de marcadores para sua identificação. Os pericitos encontram-se ubiquamente distribuídos pelos tecidos do corpo, presentes nas paredes dos microvasos. Possuem morfologia alongada, semelhante a fibroblastos, e emitem projeções que circundam e se sobrepõem à monocamada de células endoteliais. Não existem marcadores exclusivos de pericitos, porém, alguns são comumente escolhidos para seu isolamento e caracterização. Os principais são: o receptor de fator de crescimento, PDFGR β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*) e o proteoglicano co-receptor de PDGF, NG2 (*Nerve/glial antigen-2*) (ATTWELL et al., 2015).

As culturas de pericitos incluídas no presente estudo se mostraram compostas por células positivas para a expressão de ambos os marcadores. Entretanto, a cultura de pericitos derivados de neuroblastoma (PNMM) foi a única que apresentou um percentual relativamente baixo de células com expressão de NG2 (22,7%). Essa baixa expressão de NG2 não parece ser uma característica de pericitos tumorais, uma vez que a positividade para expressão de NG2 foi de 99,6% na cultura de pericitos derivados de ependimoma (P21). Sabe-se que o NG2 está envolvido em via sinalização que regula processos como proliferação e migração celular (STALLCUP, 2002). Embora a migração celular possa

ser facilitada por NG2 via aumento de polarização e adesão focal (GUNAWAN et al., 2006), não há uma aparente correlação nos pericitos PNMM, uma vez que esses apresentaram índices de migração superiores aos verificados para a outra amostra de pericitos tumorais (P21). Por outro lado, estudos com astrocitoma humano da linhagem U251MG demonstraram que a expressão de NG2 favorece a proliferação celular e que esse efeito envolve fosforilação de NG2 no resíduo de treonina 2314 (MAKAGIANSAR et al., 2007). De fato, o índice de proliferação de pericitos PNMM após 48h foi inferior ao índice de proliferação dos pericitos tumorais P21. É interessante notar que o NG2 também é considerado um marcador de diversos progenitores de células do sistema nervoso central, como oligodendrócitos; de CTMs em diferenciação em condrócitos, adipócitos e células musculares; e de células de músculo liso vasculares (OZERDEM; MONOSOV; STALLCUP, 2002; TROTTER; KARRAM; NISHIYAMA, 2010).

O PDGFR β parece estar envolvido no recrutamento de pericitos para o espaço perivascular durante a angiogênese e o silenciamento de sua expressão afeta morfogênese dos microvasos, levando a alterações como na densidade, comprimento, diâmetro e número de ramificações; além de anormalidades na camada de células endoteliais (HELLSTRÖM et al., 2001). Além disso, formas mutantes deste receptor já foram descritas em células tumorais de alguns tipos de câncer raros e em pericitos de tumores sólidos (ÖSTMAN; HELDIN, 2007; OSTMAN, 2004). Sua eficácia como alvo de terapias anticâncer já foi demonstrada em ensaios pré-clínicos (MCARTHUR et al., 2005; ROBERTS et al., 2005). Nesse contexto, a positividade de PDGFR β detectada nas duas culturas de pericitos derivados de tumores de sistema nervoso é um indicador positivo dessa estratégia.

Outro marcador bastante utilizado, geralmente, por trabalhos que exploram a multipotencialidade dos pericitos e sua relação com CTMs, é o CD146 (CAPLAN, 2008;

COVAS et al., 2008; CRISAN et al., 2008). Este marcador está presente nos pericitos, em células endoteliais (e seus progenitores), células de músculo liso e CTMs perivasculares (BARDIN et al., 1996; SORRENTINO et al., 2008). Está envolvido com adesão célula-a-célula e com vias de sinalização de proteínas que participam da diferenciação celular (BARDIN et al., 2001).

Nossos resultados de caracterização dos marcadores de pericitos por citometria de fluxo mostraram que, embora sejam populações heterogêneas, como esperado para esse tipo celular, apresentaram altos níveis de marcação positiva para ao menos um desses três marcadores testados. Outros tipos celulares, como por exemplo fibroblastos, possuem marcação baixa para CD146 (menor que 10%) e a expressão de PDGFR β e NG2 somente foi relatada em CAFs (COVAS et al., 2008; ORIMO; WEINBERG, 2007).

Os pericitos e as células-tronco mesenquimais compartilham diversos marcadores (CRISAN et al., 2008). Portanto, como esperado, apresentaram positividade para o CD90 e CD73, sendo que este último se destacou por apresentar uma marcação positiva de 100% em todas as células estudadas.

Assim, o perfil de expressão de marcadores encontrado nas culturas de pericitos de tecidos não tumorais é condizente com esperado. Não obstante, o perfil de expressão de marcadores detectado nas culturas de pericitos derivados de tumores foi mais heterogêneo. Entretanto, outros estudos de caracterização de pericitos tumorais também encontraram perfis alternativos de expressão de marcadores. Em tumores malignos de tecidos perivasculares, os pericitos apresentam menor expressão dos marcadores PDGFR β e CD146, o que poderia indicar uma perda na diferenciação dessas células (SHEN et al., 2015). Até o momento, não foram encontrados na literatura outros estudos utilizando pericitos extraídos de tumores malignos.

No entanto, pericitos reconhecidamente formam estruturas tubulares de cordões celulares, principalmente quando co-cultivados com o auxílio de células endoteliais. No presente trabalho todas as culturas de pericitos, inclusive as de pericitos tumorais, demonstraram efetiva capacidade de formarem essas estruturas tubulares, mesmo na ausência de co-cultivo com células endoteliais. Este ensaio foi importante, pois demonstrou que as células derivadas de tumor possuíam capacidade angiogênica, excluindo-se a possibilidade de serem CTMs, uma vez que este último tipo celular não possui a mesma propriedade.

Uma vez caracterizadas as culturas de pericitos, a próxima etapa foi verificar a expressão dos genes codificadores dos membros da família LOX nessas células. Como não haviam estudos similares da literatura, fez-se uma análise da expressão dessas enzimas que englobou outros tipos celulares relacionados, como células-tronco mesenquimais e HUVECs, cuja expressão já foi relatada e se mostrou importante num contexto tumoral (BAKER et al., 2013; EL-HAIBI et al., 2012).

De maneira geral, os pericitos de tecido normal e aquele derivado de ependimoma apresentaram significativamente maior expressão de *LOXL3*, enquanto que os pericitos derivados de neuroblastoma apresentaram um padrão de expressão das enzimas da família LOX mais similar ao de CTMs, com destaque para a expressão de *LOXL1*.

Já foi amplamente demonstrado que a família LOX é capaz de agir sobre a progressão tumoral, influenciando processos importantes como angiogênese e metástase (BAKER et al., 2013; OSAWA et al., 2013; PICKUP et al., 2013). Porém, não há dados correlacionando pericitos a esses efeitos. A *LOXL3* é a enzima que possui menos dados na literatura da família LOX, porém, sabe-se que suas funções sobre a matriz extracelular são similares aos demais membros (SZAUTER; CSISZAR, 2011).

A LOXL1, por sua vez, já foi proposta como sendo um gene supressor tumoral por meio da inibição da via de sinalização Ras/ERK em câncer de bexiga (WU et al., 2007). Além disso, foi mostrado que sua interação indireto com Snail1 age na promoção da transição epitélio-mesenquima em células epiteliais (LACZKO; SZAUTER; CSISZAR, 2014). Sendo assim, podemos observar por meio do estudo dos marcadores e da expressão dos genes codificadores da família LOX, que os pericitos PNMM possuem um perfil mais similar às CTMs, indicando possivelmente uma característica de menor diferenciação dessas células. Dentro dessa hipótese, de fato, os pericitos tumorais PNMM apresentaram uma maior atividade de migração quando comparados aos pericitos tumorais P21.

Os pericitos têm um importante papel estrutural na parede dos vasos sanguíneos, porém, uma vez ativados, podem também realizar uma série de funções dinâmicas que podem colaborar para a formação de um microambiente favorável à progressão tumoral (RIBEIRO; OKAMOTO, 2015). Os pericitos quando expostos a certos estímulos são ativados e passam por alterações morfológicas e funcionais. Neste cenário, os pericitos proliferam, migram, participam da angiogênese e secretam diversos fatores e enzimas que modulam estas atividades, como enzimas moduladoras da matriz extracelular (BERGERS; BENJAMIN, 2003; STAPOR et al., 2014).

Sendo assim, investigou-se a hipótese de que enzimas da família LOX produzidas por pericitos seriam capazes de causar alterações em atividades dessas células essenciais para suas contribuições durante o desenvolvimento tumoral, são elas: proliferação, migração e formação *in vitro* de vasos sanguíneos.

O bloqueio da atividade de membros da família LOX, utilizando-se o composto β APN, não alterou a viabilidade das células no tratamento de 24 horas, assegurando que os efeitos observados não seriam decorrentes da toxicidade da droga.

Em células musculares vasculares, foi demonstrado que o propeptídeo de LOX foi capaz de alterar a proliferação e síntese de DNA e parece contribuir para a transformação patológica dessas células (HURTADO et al., 2008). Outro estudo mais recente conduzido em modelo animal transgênico, relatou a importância da LOX para o remodelamento vascular por meio da inibição da sua expressão gênica também em células musculares dos vasos, reduzindo consideravelmente sua proliferação e capacidade de responder a mitógenos (ORRIOLS et al., 2014). Entretanto, a proliferação dos pericitos se manteve inalterada entre os grupos testados.

A LOX está fortemente relacionada com a capacidade metastática de diversos tipos tumorais (BARKER; COX; ERLER, 2012; ERLER; GIACCIA, 2006; SION; FIGG, 2006). Uma série de trabalhos mostra sua correlação com o aumento da migração e invasão de células tumorais (KIRSCHMANN et al., 2002; PAYNE et al., 2005). Além disso, o silenciamento gênico da LOX em células endoteliais inibe sua migração e formação de estruturas tubulares *in vitro*. De forma complementar, o tratamento dessas células com β APN diminuiu a angiogênese tumoral e micrometástases em modelo animal de melanoma (OSAWA et al., 2013).

No presente estudo, a inibição e migração celular pelo tratamento com β APN sugere que as enzimas LOX também sejam relevantes à migração de pericitos de tecidos normais e de tumores. Outro dado importante fornecido por esse experimento é a diferença de respostas ao estímulo quimioatraente entre os pericitos isolados de tecidos normais e àqueles de origem tumoral. Os pericitos derivados de tecido tumoral, em especial o proveniente de neuroblastoma, apresentaram maior atividade de migração, alcançando maiores índices em tempo mais curtos.

Quanto às propriedades angiogênicas, primeiramente, é importante notar que a cinética de formação de vasos *in vitro* foi diferente, comparando-se pericitos não-

tumorais com pericitos derivados de tumores. Neste caso, observou-se que o pico de formação de estruturas tubulares por pericitos tumorais levou maior tempo para ocorrer, em relação aos pericitos de tecido normal. Além disso, a desestabilização dessas estruturas tubulares também ocorreu de forma mais gradual nas culturas de pericitos tumorais, comparativamente às culturas de pericitos de tecido normal. Assim, em média, o intervalo entre o início da formação e a desestruturação dessas estruturas tubulares foi de 6 horas para os pericitos provenientes de tecido normal, em contraste com o intervalo de cerca de 12 horas encontrado para os pericitos de tecido tumoral.

Os resultados também indicam que o β APN prejudica o desenvolvimento normal dessas estruturas, retardando ou diminuindo sua eficiência. Esse efeito parece ser mais exacerbado em pericitos tumorais, principalmente, no caso no PNMM, uma vez que a cinética de formação de vasos foi alterada pelo tratamento com β APN de forma a atrasar o tempo necessário para formar o máximo número de estruturas vasculares observáveis. Salienta-se novamente que tais comparações funcionais de pericitos de tecido normal e tumoral são inexistentes na literatura corrente.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a atividade de enzimas da família LOX em pericitos isolados de tecido normal e tumoral é capaz de influenciar suas propriedades de migração e formação de vasos *in vitro* e que, portanto, pode ser considerada como um fator potencialmente importante na ativação dos pericitos e suas funções no microambiente tumoral.

Conclusões

1. Foram caracterizadas quatro culturas de pericitos, duas provenientes de tecidos normais e duas isoladas de tecidos tumorais. Essas culturas mostraram-se constituídas de populações celulares heterogêneas com relação a expressão de marcadores de pericitos (CD146, NG2, PDGFR β) e de células-tronco mesenquimais (CD90 e CD73), porém, homogêneas quanto à baixa expressão de marcadores de células endoteliais e hematopoiéticas (CD31 e CD45). As culturas de pericitos derivados de tumores apresentaram maior variação no perfil desses marcadores em comparação às culturas de pericitos de tecidos não-tumorais.
2. Detectou-se nas quatro culturas de pericitos utilizadas no estudo a expressão de genes codificadores das enzimas LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 e LOXL4. Os pericitos A16, M19 e P21 apresentaram maior expressão de LOXL3, enquanto as CTMs expressam maiores níveis de LOXL1, assim como os pericitos tumorais PNMM. As HUVECs possuem os menores níveis de expressão das enzimas em relação às demais células testadas.
3. O tratamento com o bloqueador de atividade de enzimas da família LOX, β APN, não alterou a proliferação dos pericitos nas condições testadas. Entretanto, esse tratamento com β APN foi capaz de inibir significativamente a migração de pericitos, bem como de diminuir significativamente a sua eficiência em gerar estruturas semelhantes à vasos *in vitro*.

Resumo

O microambiente tumoral é composto por células, como fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais e pericitos, envoltas por uma matriz extracelular, além de possuir fatores solúveis que participam da comunicação celular. Nas últimas décadas, têm-se entendido cada vez melhor seu papel na iniciação e progressão dos tumores. É de fundamental importância, portanto, entender a biologia dos seus componentes e como podem agir em favor do desenvolvimento tumoral. Diversos trabalhos demonstram que há uma associação entre a presença dos pericitos nos vasos tumorais com a agressividade e prognóstico de alguns tipos de câncer. Uma vez ativadas, além do papel estrutural, essas células modulam as atividades das células endoteliais durante a formação de novos vasos, além de adquirirem propriedades como proliferação e migração. Neste contexto, os pericitos passam a secretar fatores importantes na comunicação célula-a-célula e liberam enzimas moduladoras na matriz extracelular. A lisil oxidase (LOX) é uma das principais enzimas que atuam sobre a matriz extracelular. Já está bem descrito que, quando superexpressa em células tumorais, a LOX pode alterar a migração e invasão dessas células, promovendo a geração de metástases. Entretanto, pouco se sabe a respeito da atuação dessa enzima sobre os demais componentes celulares do estroma tumoral, como os pericitos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar se a enzima LOX é relevante para a ativação de propriedades dos pericitos que possam contribuir para suas funções pró-tumorigênicas, como migração, proliferação e formação de vasos. Os resultados foram gerados avaliando essas atividades dos pericitos após pré-tratamento de 24 horas com β -aminopropionitrile (β APN), um inibidor irreversível da LOX. Foram utilizadas duas linhagens de pericitos derivados de tecido normal (adiposo e muscular) e duas linhagens de pericitos provenientes de tecido tumores do sistema nervoso central (neuroblastoma e ependimoma). Este composto foi capaz de diminuir a capacidade de migração das células de todas as linhagens testadas e, de maneira geral, tornou o processo de formação de estruturas tubulares *in vitro* menos eficiente. Entretanto, não foram observadas alterações na proliferação celular. Os dados indicam, portanto, que a enzima LOX pode ser importante para a ativação dos pericitos e, possivelmente, influenciam no seu comportamento no microambiente tumoral.

Abstract

The tumor microenvironment is composed of non-cancer cells, such as fibroblasts, immune cells, endothelial cells and pericytes, surrounded by an extracellular matrix, in addition to soluble factors involved in cellular crosstalk. In the last decades, it has been better understood its role in the initiation and progression of tumors. It is critical, therefore, to understand the biology of its components and how they can act in favor of tumor development. Several studies show an association between the presence of pericytes in tumor vessels with aggressiveness and prognosis of some cancers. Once activated, these cells modulate the activities of endothelial cells during the new vessels formation, and acquire properties as proliferation and migration. In this context, pericytes triggers the secretion of important factors in cell-to-cell communication and release modulating enzymes of extracellular matrix. The lysyl oxidase (LOX) is one of the main enzymes that act on the extracellular matrix. It is well described that when overexpressed in tumor cells, LOX can alter the migration and invasion of these cells, promoting the generation of metastases. However, little is known about the role of this enzyme over other cellular components of the tumor stroma, such as pericytes. Therefore, the aim of this study was to verify whether LOX enzyme is relevant to the activation of properties of the pericytes that could contribute to its pro-tumorigenic functions such as migration, proliferation and vessel formation. All the results were generated by evaluation of the activities of these pericytes after 24 hours pretreatment with β -aminopropionitrile (β APN), an irreversible inhibitor of LOX. This study used two cell lines of pericytes derived from normal tissue (fat and muscle) and two isolated from tissue of the central nervous system. The β APN was able to reduce the migration of cells of all tested cell lines and, in general, alter the tubular formation *in vitro*. However, changes in cell proliferation weren't observed. The data showed, that the LOX family may be important for the activation of pericytes and possibly influence on their behavior in the tumor microenvironment.

Referências Bibliográficas

- ALLT, G.; LAWRENSON, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. **Cells, tissues, organs**, v. 169, n. 1, p. 1–11, jan. 2001.
- ARLT, A. et al. Autocrine Production of Interleukin 1{beta} Confers Constitutive Nuclear Factor {kappa}B Activity and Chemoresistance in Pancreatic Carcinoma Cell Lines. **Cancer Res.**, v. 62, n. 3, p. 910–916, 1 fev. 2002.
- ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. Endothelial/pericyte interactions. **Circulation research**, v. 97, n. 6, p. 512–23, 16 set. 2005.
- ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Developmental cell**, v. 21, n. 2, p. 193–215, 16 ago. 2011.
- ATTWELL, D. et al. What is a pericyte? **Jcbfm**, p. 6–10, 2015.
- BAIS, M. V et al. Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways. **Oncogene**, v. 34, n. 15, p. 1928–37, 9 abr. 2015.
- BAKER, A.-M. et al. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. **Cancer research**, v. 73, n. 2, p. 583–94, 15 jan. 2013.
- BARDIN, N. et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. **Tissue antigens**, v. 48, n. 5, p. 531–9, nov. 1996.
- BARDIN, N. et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3677–84, 15 dez. 2001.
- BARKER, H. E.; COX, T. R.; ERLER, J. T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 8, p. 540–52, ago. 2012.
- BARLOW, K. D. et al. Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde? **Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 6, n. 1, p. 1–17, abr. 2013.
- BERENBLUM, I.; SHUBIK, P. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **British journal of cancer**, v. 1, n. 4, p. 383–91, dez. 1947.
- BERGERS, G. et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. v. 111, n. 9, p. 1287–1295, 2003.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401–10, jun. 2003.

- BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro-oncology**, v. 7, n. 4, p. 452–64, out. 2005.
- BIRBRAIR, A. et al. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 307, n. 1, p. C25–38, 1 jul. 2014.
- CALON, A. et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. **Nature Genetics**, v. 47, n. 4, p. 320–329, 23 fev. 2015.
- CANFIELD, A. E. et al. Role of pericytes in vascular calcification: a review. **Zeitschrift für Kardiologie**, v. 89 Suppl 2, p. 20–7, jan. 2000.
- CAO, Y. et al. Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 119, n. 2, p. 313–24, 15 jan. 2013.
- CAPLAN, A. I. All MSCs Are Pericytes? **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 229–230, 2008.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 417–427, jun. 2011.
- CASTELLS, M. et al. Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 9545–9571, 2012.
- CHENG, L. et al. Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 139–152, 2013.
- CONDAMINE, T. et al. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 97–110, 14 jan. 2015.
- COOKE, V. G. et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. **Cancer cell**, v. 21, n. 1, p. 66–81, 17 jan. 2012.
- COVAS, D. T. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 5, p. 642–654, 2008.
- COX, T. R.; ERLER, J. T. Lysyl oxidase in colorectal cancer. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 305, n. 10, p. G659–66, 15 nov. 2013.
- CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 301–13, 11 set. 2008.
- CRISAN, M. et al. Perivascular Multipotent Progenitor Cells in Human Organs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1176, n. 1, p. 118–123, 25 set. 2009.

- CSISZAR, K. Lysyl Oxidases : A Novel Multifunctional Amine Oxidase Family. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 70, p. 1–30, 2001.
- DENTILLO, D. B. et al. Deregulation of LOXL1 and HTRA1 gene expression in endometriosis. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 17, n. 11, p. 1016–23, 1 nov. 2010.
- DEVI, P. Basics of carcinogenesis. **Health Adm**, n. 1, p. 16–24, 2004.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.
- DORE-DUFFY, P. et al. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 613–24, maio 2006.
- DORE-DUFFY, P.; CLEARY, K. Morphology and properties of pericytes. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 686, p. 49–68, jan. 2011.
- EGGINTON, S. et al. The role of pericytes in controlling angiogenesis in vivo. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 476, p. 81–99, jan. 2000.
- EL-HAIBI, C. P. et al. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 43, p. 17460–5, 23 out. 2012.
- ERLER, J. T. et al. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. **Cancer cell**, v. 15, n. 1, p. 35–44, 6 jan. 2009.
- ERLER, J. T.; GIACCIA, A. J. Lysyl Oxidase Mediates Hypoxic Control of Metastasis. **Cancer Research**, v. 66, n. 21, p. 10238–10241, 2006.
- FARRINGTON-ROCK, C. et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. **Circulation**, v. 110, n. 15, p. 2226–32, 12 out. 2004.
- FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 161, n. 2, p. 851–8, 15 jun. 1989.
- FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **British journal of cancer**, v. 108, n. 3, p. 479–85, 19 fev. 2013.
- FOLKMAN, J. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 133, n. 2, p. 275–88, 1 fev. 1971.
- FRANCO, M. et al. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2906–17, 8

set. 2011.

FURUHASHI, M. et al. Platelet-Derived Growth Factor Production by B16 Melanoma Cells Leads to Increased Pericyte Abundance in Tumors and an Associated Increase in Tumor Growth Rate Platelet-Derived Growth Factor Production by B16 Melanoma Cells Leads to Increased Pericyte Abu. p. 2725–2733, 2004.

GEE, M. S. et al. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 1, p. 183–93, jan. 2003.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and tissue research**, v. 314, n. 1, p. 15–23, out. 2003.

GHAJAR, C. M. et al. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. **Nature cell biology**, v. 15, n. 7, p. 807–17, jul. 2013.

GHIABI, P. et al. Endothelial cells provide a notch-dependent pro-tumoral niche for enhancing breast cancer survival, stemness and pro-metastatic properties. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112424, 11 jan. 2014.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L.; WIRTZ, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 6, p. 430–9, jun. 2014.

GLOBOCAN. **GLOBOCAN, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS).**

GUNAWAN, R. C. et al. Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 9, p. 4250–8, 25 abr. 2006.

HAMMES, H.-P. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 37 Suppl 1, p. 39–43, abr. 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HELLSTRÖM, M. et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. **Development**, v. 126, n. 14, p. 3047–55, 1999.

HELLSTRÖM, M. et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 3, p. 543–53, 30 abr. 2001.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular research**, v. 32, n. 4, p. 687–98, out. 1996.

HURTADO, P. A. et al. Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 366, n. 1, p. 156–61, 1 fev. 2008.

KAGAN, H. M.; LI, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 4, p. 660–72, 1 mar. 2003.

KIRSCHMANN, D. A et al. A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion. p. 4478–4483, 2002.

KITAMURA, T.; QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 73–86, 23 jan. 2015.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 4, p. 198–213, abr. 2015.

LACZKO, R.; SZAUTER, K. M.; CSISZAR, K. LOXL1-associated candidate epithelial pathomechanisms in exfoliation glaucoma. **Journal of glaucoma**, v. 23, n. 8 Suppl 1, p. S43–7, 2014.

LAPOINTE, J. et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 811–6, 20 jan. 2004.

LU, J. et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. **Cancer cell**, v. 23, n. 2, p. 171–85, 11 fev. 2013.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.

LUCERO, H. A; KAGAN, H. M. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 19-20, p. 2304–16, out. 2006.

MAKAGIANSAR, I. T. et al. Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC α helps balance cell proliferation and migration. **The Journal of cell biology**, v. 178, n. 1, p. 155–65, 2 jul. 2007.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 231–7, abr. 2010.

MCARTHUR, G. A. et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 4, p. 866–73, 1 fev. 2005.

MEYRICK, B.; REID, L. Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat. **The Anatomical Record**, v. 193, n. 1, p. 71–97, 1978.

MILJKOVIC-LICINA, M. et al. Targeting olfactomedin-like 3 inhibits tumor growth by impairing angiogenesis and pericyte coverage. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 12, p. 2588–99, dez. 2012.

MOHAMMED, M. K. et al. Opening the LOX to bone metastasis: The role of secreted lysyl oxidase in skeletal recurrence of breast cancers. **Genes & Diseases**, set. 2015.

MOLNAR, J. et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1647, n. 1-2, p. 220–224, abr. 2003.

MÜERKÖSTER, S. et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. **Cancer research**, v. 64, n. 4, p. 1331–7, 15 fev. 2004.

NAKAGOMI, T. et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 33, n. 6, p. 1962–74, jun. 2015.

NEIVA, K. G. et al. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 6, p. 583–93, jun. 2009.

NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 27, p. 1–7, abr. 2014.

NISHIOKA, T.; EUSTACE, A.; WEST, C. Lysyl Oxidase: From Basic Science to Future Cancer Treatment. **Cell Structure and Function**, v. 37, n. 1, p. 75–80, 28 mar. 2012.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, jul. 2014.

OCHS, K. et al. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. **Journal of neuroimmunology**, v. 265, n. 1-2, p. 106–16, 15 dez. 2013.

ORIMO, A.; WEINBERG, R. A. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. **Cancer biology & therapy**, v. 6, n. 4, p. 618–9, abr. 2007.

ORRIOLS, M. et al. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling. Insight from a new animal model. **Thrombosis and haemostasis**, v. 112, n. 4, p. 812–24, 6 out. 2014.

OSAWA, T. et al. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. **British journal of cancer**, v. 109, n. 8, p. 2237–47, 2013.

- OSTMAN, A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 4, p. 275–86, ago. 2004.
- ÖSTMAN, A.; HELDIN, C. PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment. n. 06, p. 247–274, 2007.
- OZERDEM, U.; MONOSOV, E.; STALLCUP, W. B. NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature. **Microvascular research**, v. 63, n. 1, p. 129–34, jan. 2002.
- OZERDEM, U.; STALLCUP, W. B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation *. p. 241–249, 2004.
- PAULSSON, J.; MICKE, P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 25, p. 61–8, abr. 2014.
- PAYNE, S. L. et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. **Cancer research**, v. 65, n. 24, p. 11429–36, 15 dez. 2005.
- PEINADO, H. et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. **The EMBO journal**, v. 24, n. 19, p. 3446–58, 5 out. 2005.
- PEIRIS-PAGÈS, M.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. **Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-GLI signalling in breast cancer cells.** *Oncotarget*, 1 maio 2015. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/PMC4484415>>. Acesso em: 12 nov. 2015
- PERRYMAN, L.; ERLER, J. T. Lysyl oxidase in cancer research. **Future oncology (London, England)**, v. 10, n. 9, p. 1709–17, jan. 2014.
- PICKUP, M. W. et al. Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor- β -deficient mouse mammary carcinomas. **Cancer research**, v. 73, n. 17, p. 5336–46, 1 set. 2013.
- PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243–53, 7 dez. 2014.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–37, nov. 2013.
- RAZA, A.; FRANKLIN, M. J.; DUDEK, A. Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. **American journal of hematology**, v. 85, n. 8, p. 593–8, ago. 2010.
- RIBEIRO, A. L.; OKAMOTO, O. K. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. **Stem cells international**, v. 2015, p. 868475, jan. 2015.
- RIMAR, D. et al. Brief report: lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis in

systemic sclerosis. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 66, n. 3, p. 726–30, mar. 2014.

ROBERTS, W. G. et al. Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 957–66, 1 fev. 2005.

RODRÍGUEZ, C. et al. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. **Cardiovascular research**, v. 79, n. 1, p. 7–13, 1 jul. 2008.

ROUGET, C. Memoire sur le developpement, la structures et les proprietes des capillaires sanguins et lymphatiques. **Archivos de Histología Normal y Patológica**, v. 5, p. 603–633, 1873.

SCHLINGEMANN, R. O. et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 6, p. 1335–47, jun. 1991.

SCHRIMPF, C.; DUFFIELD, J. S. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 20, n. 3, p. 297–305, maio 2011.

SHEN, J. et al. Pericyte Antigens in Perivascular Soft Tissue Tumors. **International journal of surgical pathology**, v. 23, n. 8, p. 638–48, dez. 2015.

SHEN, M. et al. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98259, 6 jan. 2014.

SIDDIKUZZAMAN; GRACE, V. M. B.; GURUVAYOORAPPAN, C. Lysyl oxidase: a potential target for cancer therapy. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 117–29, jun. 2011.

SION, A. M.; FIGG, W. D. Lysyl oxidase (LOX) and hypoxia-induced metastases. **Cancer biology & therapy**, v. 5, n. 8, p. 909–11, 2006.

SMITH-MUNGO, L. I.; KAGAN, H. M. Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. **Matrix Biology**, v. 16, n. 7, p. 387–398, fev. 1998.

SORRENTINO, A. et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 8, p. 1035–1046, 2008.

STALLCUP, W. B. The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. **Journal of Neurocytology**, v. 31, n. 6-7, p. 423–435, 2002.

STAPOR, P. C. et al. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. **Journal of vascular research**, v. 51, n. 3, p. 163–74, jan. 2014.

SUN, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. **Cancer letters**, 10 ago. 2015.

- SUNDBERG, C. et al. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 74, n. 2, p. 452–66, fev. 1996.
- SZAUTER, K.; CSISZAR, K. LOXL3 (lysyl oxidase-like 3). 9 nov. 2011.
- TRACKMAN, P. C. et al. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 12, p. 8666–8671, 25 abr. 1992.
- TRACKMAN, P.; SAXENA, D.; BAIS, M. Two Functions of Lysyl Oxidases: Extracellular Matrix Maturation and Cell Proliferation. **FASEB J**, v. 29, n. 1_Supplement, p. 570.18–, 1 abr. 2015.
- TROTTER, J.; KARRAM, K.; NISHIYAMA, A. NG2 cells: Properties, progeny and origin. **Brain research reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 72–82, maio 2010.
- VALADARES, M. C. et al. Human adipose tissue derived pericytes increase life span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J mice. **Stem cell reviews**, v. 10, n. 6, p. 830–40, dez. 2014.
- VIEIRA, N. M. et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. **Cell transplantation**, v. 21, n. 7, p. 1407–17, jan. 2012.
- WANG, S. et al. Pericytes regulate vascular basement membrane remodeling and govern neutrophil extravasation during inflammation. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45499, jan. 2012.
- WARD, S. T. et al. Evaluation of serum lysyl oxidase as a blood test for colorectal cancer. **European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 40, n. 6, p. 731–8, jun. 2014.
- WU, G. et al. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. **Cancer research**, v. 67, n. 9, p. 4123–9, 1 maio 2007.
- XIAN, X. et al. Pericytes limit tumor cell metastasis. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 3, p. 645–51, 2006.
- XIAO, Q.; GE, G. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. **Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 5, n. 3, p. 261–73, dez. 2012.
- YAMAGISHI, S.; IMAIZUMI, T. Pericyte biology and diseases. **International journal of tissue reactions**, v. 27, n. 3, p. 125–35, jan. 2005.
- YANG, X. et al. Inactivation of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile inhibits hypoxia-

induced invasion and migration of cervical cancer cells. **Oncology reports**, v. 29, n. 2, p. 541–8, fev. 2013.

YONENAGA, Y. et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. **Oncology**, v. 69, n. 2, p. 159–66, jan. 2005.

ZHANG, L.; NISHIHARA, H.; KANO, M. R. Pericyte-Coverage of Human Tumor Vasculature and Nanoparticle Permeability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 5, p. 761–766, 2012.

ZHANG, Q. et al. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50946, 28 dez. 2012.

ZHANG, Z. et al. Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype. **Cancer research**, v. 74, n. 10, p. 2869–81, 15 maio 2014.

ZIMMERMANN, K. Der feinere bau der blutcapillares. **Z Anat Entwicklungsgesch**, v. 68, p. 29–109, 1923.

ZLOKOVIC, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178–201, 24 jan. 2008.

Biografia

Aline Lopes Ribeiro

Mestrado em andamento em Biologia/Genética pela Universidade de São Paulo e possui graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica pela Universidade Federal de São Paulo (2013).

Formação acadêmica

2014

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Genética) (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Oswaldo Keith Okamoto.

2010 – 2013

Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica (Biomedicina).

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo - SP.

Título: Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais murinas em camundongos com adenocarcinoma mamário.

Orientador: Tatiana Jazedje da Costa Silva.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Atuação na Pesquisa Científica

2012 - 2013 Iniciação Científica com Bolsa (FAPESP)

Projeto: “Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais murinas em camundongos com adenocarcinoma mamário”.

Áreas: Imunologia e Células-tronco. Laboratório de Imunologia dos tumores. Edifício de Ciências Biomédicas. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP.

2011 - 2012 Iniciação Científica com Bolsa (PIBIC/ CNPq)

Projeto: “Estudo dos efeitos do lítio sobre apoptose e autofagia em modelo farmacológico para a doença de *Huntington* (3-NP)”.

Área: Farmacologia. Setor modo de ação de drogas. Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP.

Formação Complementar

2013 - 2013 Curso de Inverno

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo - SP.

2013 - 2013 Curso de “Biologia Molecular das Células-tronco”

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo - SP

2010 - 2010 Curso de Reprodução Humana - Visão Laboratorial.

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo - SP.

2010 - 2010 Curso de Atualização da literatura em morte celular.

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo - SP.

2009 - 2009 Curso de Células-Tronco: Definições e Terapias.

Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP.

2009 - 2009 Curso de Terapia Gênica.

Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

2009 - 2009 Curso de Células-tronco.

Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

Idiomas

Inglês – Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Eventos

Participação em eventos, congressos e simpósios

1. Participação no 1º Congresso Nacional de Biomedicina (CONAB)
2. Apresentação oral em palestra sobre “Células-tronco e terapia gênica” no XI Curso de Inverno da Universidade Federal de São Paulo. 2013.
3. Apresentação oral e pôster no V Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação com o trabalho “Estudo dos efeitos do lítio sobre apoptose e autofagia em modelo farmacológico para a doença de *Huntington* (3-NP)”. 2012.
4. Apresentação oral e pôster no XIX Congresso de Iniciação Científica com o trabalho “Indução de morte celular pelo ácido 3-nitropropiónico utilizado como modelo farmacológico para o estudo da doença de *Huntington*”. 2011.
5. Participação no Simpósio da Sociedade Internacional de Morte Celular. 2011.
6. Participação na XIII Semana Temática da Biologia - USP. 2009.
7. Participação na 1ª Semana Científica e Cultural da UNIFESP Diadema (SCCUD). 2009.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **RIBEIRO, A. L.**; Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. *Stem Cells International*, v. 2015, p. 1-8, 2015.
2. JAZEDJE, T. ; **RIBEIRO, A. L.** ; PELLATI, M. ; DE SIQUEIRA BUENO, H. M. ; NAGATA, G. ; TRIERVEILER, M. ; RODRIGUES, E. G. ; ZATZ, M. . Human Mesenchymal Stromal Cells Transplantation May Enhance or Inhibit 4T1

Murine Breast Adenocarcinoma through Different Approaches. *Stem Cells International*, v. 2015, p. 1-11, 2015.