

# Tese de Mestrado

Salamanca, 28 de Junho de 2010

Ludovico Hélder Martins Alves



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

Departamento de Fisiología y  
Farmacología



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências da Saúde

## EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA S DE ENDOGLINA SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR: ANÁLISIS DE LA MEDIACIÓN DE LAS RUTAS DE MAPK EN EL PROCESO

Efeito da expressão da isoforma S de Endoglina sobre a migração celular:  
Análise da mediação das rotas de MAPK no processo

<b>Índice de Figuras</b>	<b>V</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>VIII</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Introdução</b>	<b>6</b>
<b>1. “Transforming Growth Factor Beta”</b>	<b>6</b>
1.1. A Superfamília TGF- $\beta$	6
1.2. Síntese de TGF- $\beta$ e Activação	8
1.3. Receptores TGF- $\beta$	10
1.4. Via de Sinalização da TGF- $\beta$	13
1.4.1. Receptores Cinase de Serina/Treonina – sinalização e regulação da TGF- $\beta$ na superfície celular	13
1.4.2. Smads - sinalização e regulação da TGF- $\beta$ da superfície celular até ao núcleo	14
1.5. Vias de Sinalização TGF- $\beta$ Não Smad	17
1.5.1. Activação da via de sinalização das ERK/MAPK por TGF- $\beta$	18
1.5.2. Activação das vias de sinalização MAPK JNK/p38 por TGF- $\beta$	20
1.6. Sinalização cruzada com outras vias	21
1.6.1. Sinalização cruzada com a via de sinalização das MAPK	21
1.6.2. Sinalização cruzada com a via PI3K/Akt	23
1.6.3. Sinalização cruzada com a via das Wnt	24
1.7. Papel biológico da TGF- $\beta$	25
1.7.1. Cancro	25
1.7.1.1. TGF- $\beta$ como supressor tumoral	26
1.7.1.2. TGF- $\beta$ TGF- $\beta$ como um promotor tumoral	27
1.7.2. Fibrose	28
<b>2. Endogлина</b>	<b>29</b>
2.1. Estrutura da endogлина	30
2.2. Endogлина e TGF- $\beta$	33
2.3. Papel biológico da endogлина	38
2.3.1. Telangiectasia Hemorrágica Hereditária	38
2.3.2. Angiogénese	40
2.3.3. Cancro	41
2.3.4. Pré-eclampsia	42

Objectivos	43
Materiais e Métodos	45
<b>1. Materiais</b>	<b>46</b>
<b>2. Métodos de cultura celular</b>	<b>46</b>
2.1. Culturas celulares	46
2.1.1. Geração de clones estáveis de mioblastos L6E9	46
2.2. Técnicas básicas em culturas celulares	47
2.2.1. Tripsinização	47
2.2.2. Contagem celular	47
2.2.3. Congelação e descongelação das linhas celulares	48
2.3. Tratamento de culturas	48
<b>3. Análise do nível de expressão de proteínas</b>	<b>49</b>
3.1. <i>Western Blot</i>	49
3.1.1. Obtenção de extractos de proteínas celulares	49
3.1.2. Determinação da concentração proteica	50
3.1.3. Preparação das amostras e electroforese	50
3.1.4. Transferência	51
3.1.5. Bloqueio e incubação com anticorpos	52
3.1.6. Revelação	53
3.1.7. Reutilização de membranas	54
<b>4. Estudo da migração celular</b>	<b>55</b>
4.1. Microscópio de Célula Viva	55
4.2. Ensaio de Reparação Tratamento de cultivos	56
4.2.1. Provas de viabilidade e eleição de concentração celular	59
4.2.2. Provas de coloração	59
4.2.3. Reparação da Superfície Celular	60
<b>Apêndice 1: Listagem de reagentes e produtos</b>	<b>61</b>
<b>Apêndice 2: Listagem de anticorpos utilizados</b>	<b>63</b>
<b>Apêndice 3: Listagem de material e equipamento utilizado</b>	<b>64</b>

Resultados e Discussão	65
<b>1. Escolher um modelo celular para o estudo do efeito da expressão da isoforma S da endoglina.</b>	<b>66</b>
<b>2. Determinação de condições de trabalho</b>	<b>67</b>
2.1. Selecção da concentração de TGF- $\beta$	68
2.2. Selecção do tempo de tratamento	69
<b>3. Estudo das diferenças na expressão e fosforilação de MAPKs em mioblastos L6E9 que expressão, ou não, L- e S-endoglina</b>	<b>71</b>
3.1. Expressão e fosforilação de ERK	72
3.2. Expressão e fosforilação de JNK	76
3.3. Expressão e fosforilação de p38	79
<b>4. Ensaio de Migração</b>	<b>83</b>
4.1. Microscopia de Célula Viva	83
<b>5. Ensaio de Reparação</b>	<b>87</b>
<b>6. Resumo da Discussão</b>	<b>92</b>
Conclusões	95
Bibliografia	97

## Índice de Figuras

Figura 1. Membros da superfamília das TGF- $\beta$ .....	7
Figura 2. Modificações Pós-transcricionais da superfamília de ligandos TGF- $\beta$ .....	9
Figura 3. Estrutura esquemática da TGF- $\beta$ .....	9
Figura 4. Um esquema simplificado dum protótipo de uma proteína receptora do Tipo I .....	12
Figura 5. Activação do receptor da TGF- $\beta$ através da orientação do receptor .....	13
Figura 6. A via de sinalização canónica TGF- $\beta$ -Smad .....	15
Figura 7. A complexa via de sinalização por TGF- $\beta$ .....	17
Figura 8. Esquema da sinalização Não Smad .....	18
Figura 9. A via de sinalização Não Smad das ERK .....	19
Figura 10. A via de sinalização Não Smad JNK/p38.....	21
Figura 11. Cross-signaling das vias da TGF- $\beta$ , MAPK e PI3K/Akt .....	22
Figura 12. Sinalização cruzada entre as vias da TGF- $\beta$ e Wnt .....	24
Figura 13. A resposta citoestática à sinalização TGF- $\beta$ /Smad .....	26
Figura 14. Representação esquemática da endogлина.....	31
Figura 15. Comparação entre as isoformas de endogлина .....	31
Figura 16. Desenho descrevendo um rude esboço da organização estrutural de cada monómero de endogлина, baseado em reconstituição .....	32
Figura 17. Gene da endogлина e os ARNm das duas isoformas .....	33
Figura 18. Modelos ilustrando o papel da endogлина no complexo receptor TGF- $\beta$ /cinase activin-like (ALK)1 na regulação de células endoteliais. ....	34
Figura 19. Possíveis papéis reguladores da endogлина independentes de TGF- $\beta$ .....	35
Figura 20. Regulação da angiogénese pela endogлина através da via de sinalização das TGF- $\beta$ .....	36
Figura 21. Modelo alternativo do papel de endogлина na troca angiogénica .....	37
Figura 22. Distribuição, frequência e tipos de mutações do gene ENG. ....	39
Figura 23. Sistema de Contagem Automática Countess (Invitrogen) .....	48
Figura 24. Processo de Electroforese .....	50
Figura 25. Esquema demonstrando a montagem do “sandwich” usado na transferência semi-seco por Trans-Blot SD (Bio-Rad).....	51
Figura 26. Cadeia de Tratamento da Membrana .....	51
Figura 27. Detecção da proteína .....	53
Figura 28. Máquina de revelação Medical X Ray Processor (Kodak) .....	53
Figura 29. Técnica de <i>Wound Healing</i> .....	55

Figura 30. Microscópio de célula viva Axiovert 200M .....	56
Figura 31. Princípio da técnica de Análise de Reparação por recurso a Stoppers .....	56
Figura 32. Processo de inserção dos stoppers nos poços .....	57
Figura 33. Processo de remoção dos stoppers nos poços. (A, B e C) .....	58
Figura 34. Área de determinação de reparação .....	58
Figura 35. Reacções intracelulares do corante CellTrackerTM .....	60
Figura 36. Expressão de L e S endoglina nos mioblastos L6E9 .....	67
Figura 37. Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de TGF $\beta$ 1 sobre pERK, pJNK e p-p38 em mioblastos mock L6E9 .....	69
Figura 38. Efeito de diferentes tempos de exposição de TGF $\beta$ 1 sobre pERK, ERK, pJNK, JNK, p38 e p-p38 em mioblastos mock L6E9.....	70
Figura 39. Comparação da endoglina entre diferentes amostras .....	72
Figura 40. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão e fosforilação de ERK em mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina .....	74
Figura 41. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a fosforilação de ERK .....	74
Figura 42. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão ERK .....	75
Figura 43. Controlo de carga de ERK e fosfo-ERK com tubulina .....	75
Figura 44. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão e fosforilação de JNK em mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina .....	77
Figura 45. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a fosforilação de JNK .....	77
Figura 46. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão de JNK .....	78
Figura 47. Controlo de carga de JNK e fosfo-JNK com tubulina .....	78
Figura 48. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão e fosforilação de p38 em mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina .....	80
Figura 49. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a activação de p38 .....	80
Figura 50. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a expressão de p38 .....	81
Figura 51. Representação da activação de p38 em função p-p38/p-38 .....	81
Figura 52. Controlo de carga de p38 e fosfo-p38 com tubulina .....	82
Figura 53. Estudo da migração das mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina através de wound-healing .....	83
Figura 54. Wound-Healing .....	84

<b>Figura 55. Estudo da migração de mioblastos Mock com tratamentos com TGF-<math>\beta</math> e inibidor de MEks U0126. ....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 56. Estudo da migração de mioblastos L-endoglina com tratamentos com TGF-<math>\beta</math> e inibidor de MEks U0126 .....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 57. Estudo da migração de mioblastos S-endoglina com tratamentos com TGF-<math>\beta</math> e inibidor de MEks U0126 .....</b>	<b>90</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1. Ligandos, Receptores Tipo I, e Smads que participam nas vias de sinalização de superfamília TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 2. Receptores de Tipo II e Tipo III e os seus ligandos .....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 3. Expressão de Endoglin (CD105) em tecidos humanos normais.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 4. Massa molecular (MM) de cada proteína e se detalham as diluições dos anticorpos correspondentes. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 5. Distância migrada e cinética de migração de mioblastos em microscopia de célula viva.....</b>	<b>86</b>

*"Being obscure in acronyms is great.  
I think I'll start making up my own."*

**-Paul Vixie-**

# *Abreviaturas*





**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ALK:** Cinase semelhante ao receptor de activina (*Activin receptor-Like Kinase*)

**AMH:** Hormona anti-Mulleriana (*Anti-Müllerian Hormone*)

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BAMBI:** Inibidor de BMP e activada associada à membrana (*BMP and activin membrane-bound inhibitor*)

**bHLH:** Estrutura hélice-loop-hélice básica

**BMPs:** Proteínas morfogénicas do osso (*Bone Morphogenetic Proteins*)

**BMPR:** Receptor de BMP (*BMP Receptor*)

**BSA:** Albumina de soro bovino (*Bovine Albumin Serum*)

**CKIs:** Inibidores do ciclo celular (*Cell Cycle Inhibitors*)

**Co-Smad:** Smads coordenadoras

**DMEM:** Médio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**Dpp:** Gene decapentaplégico

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetracético

**EEM:** Erro Estandarte da Média

**EGF:** Factor de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)

**EMT:** Transição epitelial para mesênquimal (*Epithelial to Mesenchymal Transition*)

**eNOS:** Sintase Endotelial do Óxido Nítrico (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*)

**ERKs:** Cinases reguladas por sinais extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinases*)

**FBS:** Soro bovino fetal (*Fetal Calf Serum*)

**FKB12:** Cis-trans isomerase peptidil-prolil, tipo FKBP (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type*)

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)

**Grb2:** Proteína ligando do receptor do factor de crescimento 2 (*Growth factor receptor binding protein 2*)

**HHT:** Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (*Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia*)

**HPC:** Factor de Crescimento Hepatócito (*hepatocyte growth factor*)

**HRP:** Peroxidase de rábano-de-cavalo (*Horse Radish Peroxidase*)

**IFN- $\gamma$ :** Interferão Gama

**IL:** Interleucina

**I-Smad:** Smads inibidoras

**JNK:** Cinase Jun N-terminal (*Jun N-terminal Kinase*)

**kDa:** Kilodalton

**kb:** milhar de bases

**LAP:** Péptido associado à latência (*Latency-Associated Peptide*)

**L-endoglina:** Endoglina grande (*Large Endoglin*)

**LTBP:** Proteína ligando de latência (*LaTency Binding Protein*)

**MAPK:** Cinases de Proteína Activadas por Mitogénios (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

**MAP3Ks:** Cinases de cinases de MAP cinases (*MAP kinase kinase kinases*)

**MH:** Domínios com homologia para *Mad* (*Mad Homology domains*)

**MKKP:** Cinases de MAP cinases (*MAP kinase kinases*)

**PAI:** Inibidor do activador de plasminógeno (*Plasminogen Activator Inhibitor*)

**PBS:** Tampão de Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PBS:** Tampão de Fosfato Salino com iões Cálcio e Magnésio

**PI3K:** Cinase do fosfatodilinositol-3 (*phosphate dylinositol-3 kinase*)

**PIP2:** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

**PIP3:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

**pb:** pares de bases

**pRb:** Proteína do retinoblastoma

**PVDF:** Difluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene Fluoride*)

**RTK:** Receptor cinase de tirosina (*receptor tyrosine kinase*)

**R-Smad:** **Smad** regulada por receptores (*Receptor-regulated Smad*)

**SARA:** Âncora de Smads para activação por receptores (*Smad anchor for receptor activation*)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)



**S-endoglina:** Endoglina pequena (*Small Endoglin*)

**SIM:** Motivo de interacção com Smads (*Smad interaction motif*)

**Smad:** Mães contra decapentaplégico pequena (*Small mothers against decapentaplegic*)

**Smurf:** Factores reguladores da ubiquitinação das Smads (*Smad ubiquitination regulatory factor*)

**STAT:** Transdutores de sinal e Activador de Transcrição (*Signal Transducers and Activator of Transcription*)

**SP:** Signal peptídico

**TAK:** Cinase activada por TGF- $\beta$  (*TGF- $\beta$ -activated kinase*)

**T $\beta$ R:** Receptor de TGF- $\beta$  (*TGF- $\beta$  Receptor*)

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crescimento Transformante Beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

**TLR:** Receptores de tipo portagem (*Toll-like Receptors*)

**TMD:** Domínio Trans-Membranar (*TransMembranar Domain*)

**ZP:** Zona Pelúcida

*"Allons-y."*

**-The Doctor-**

5

# *Introdução*



# 1. “Transforming Growth Factor Beta”

A família do factor de crescimento TGF- $\beta$  regula vários processos, em espécies tão diversas como moscas ou humanos. Desde que foi descoberta, no começo dos anos 80, esta família foi considerada como um importante regulador da proliferação, diferenciação, mobilidade, adesão, organização celular e morte celular programada (Massague 1998).

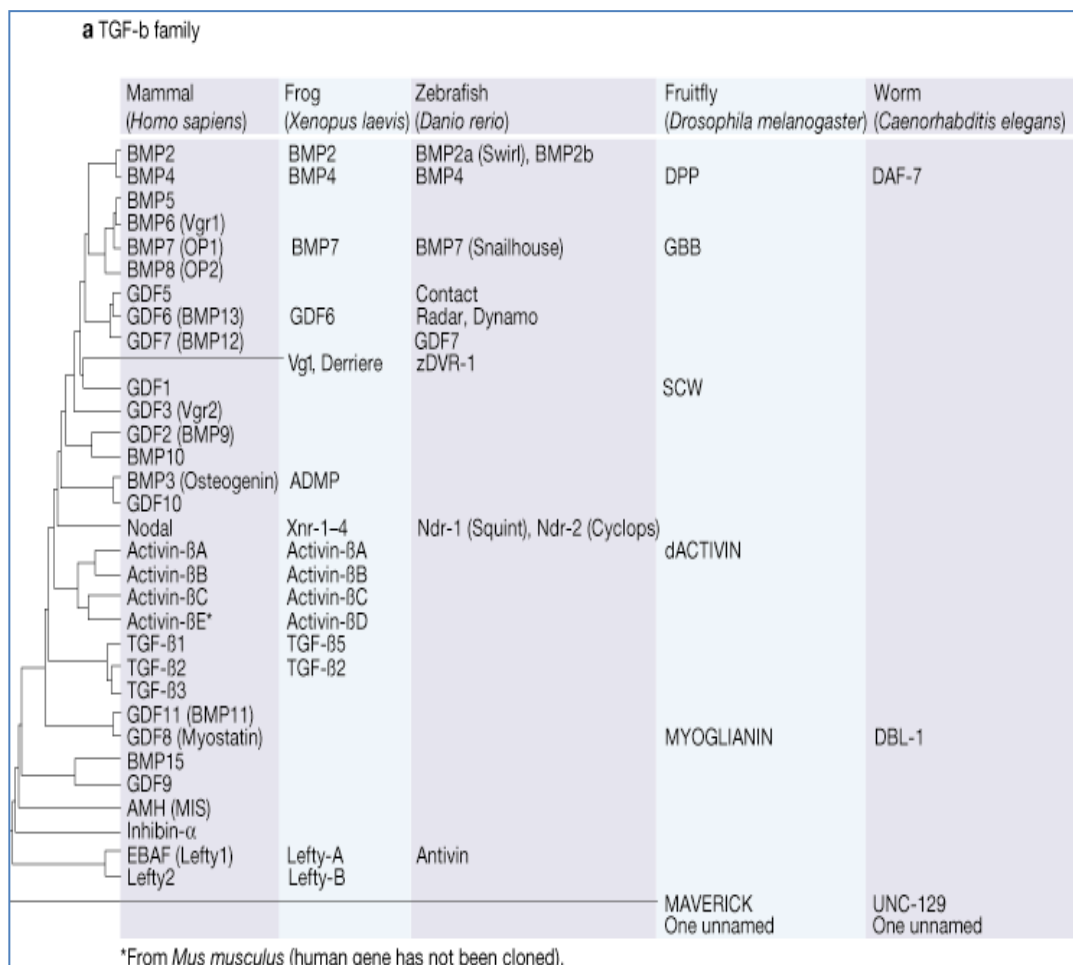
Os membros da família TGF- $\beta$  desempenham tarefas fundamentais durante o desenvolvimento embrionário e na homeostase dos tecidos em organismos metazoários. Investigação desenvolvida nos últimos anos clarificou sobre o funcionamento da rede de transdução da família de sinais TGF- $\beta$ . Esta rede envolve receptores ligados a cinase de serina/treonina e os seus substratos, as proteínas Smad, que se deslocam para o núcleo após activação, onde em associação com ligandos do ADN, activam a transcrição de genes específicos. Diferentes classes de receptores, proteínas Smad e ligandos do ADN, permitem, de uma maneira específica para cada célula, que TGF- $\beta$  possua uma natureza multifuncional (Massague 1998).

## 1.1 A Superfamília TGF- $\beta$

A superfamília TGF- $\beta$  inclui vários factores de diferenciação e crescimento, relacionados entre si e que as distintas espécies apresentam grande conservação evolutiva (Massague and Gomis 2006).

Na natureza, os TGF- $\beta$ s *per se* podem ser encontradas em cinco isoformas, três das quais são expressas em mamíferos e conhecidas como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, e TGF- $\beta$ 3. Os TGF- $\beta$ s e os seus receptores são ubiqüitariamente expressos na maioria dos tecidos e células do organismo, exigindo que o TGF- $\beta$  seja regulada por uma complexa e extensa série de mediadores celulares de modo a adquirir significância e ser capaz de gerir com facilidade os importantes processos em que esta superfamília está envolvida. Esta família também inclui as nodais, activinas, proteínas morfogénicas do osso (BMPs), miostatinas, hormona anti-Muelleriana e inibinas (Khalil 1999).

Com mais de 42 membros codificados no genoma humano, sete na *Drosophila melanogaster*, e quatro na nematoda *Caenorhabditis elegans*, a TGF- $\beta$  e os membros da sua família marcam a sua presença em múltiplos organismos. Membros desta superfamília, podem, tal como as TGF- $\beta$ , ser produzidos em vários tipos celulares ou ser específicas de determinados tipos celulares, como é o caso da miostatina (Massague and Gomis 2006).



**Fig. 1. Membros da superfamília das TGF- $\beta$ .** Membros da superfamília das TGF- $\beta$  e a sua presença em cinco espécies diferentes.

Acompanhando a diversidade da família está o seu papel como reguladora de uma vasta gama de actividades biológicas que ocorrem durante diferentes partes do ciclo de vida do organismo. Membros da família TGF- $\beta$  podem realizar as suas funções a partir da fase embrionária até à vida adulta, como é o caso das proteínas morfogénicas do osso. Também podem estar activas por meros instantes durante o desenvolvimento de órgãos, como é o caso da hormona anti-Muelleriana. No seu conjunto, a superfamília TGF- $\beta$  é um paradigma da versatilidade dos complexos reguladores ((Massague and Gomis 2006).

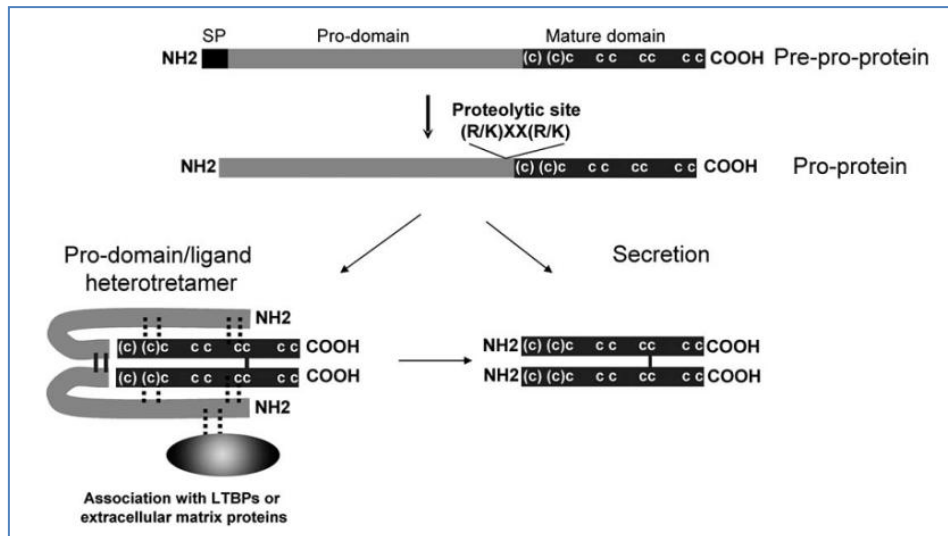
Em termos de classificação, a família está organizada com base nas similaridades das suas seqüências. Moléculas de TGF- $\beta$  podem ser divididas em TGF- $\beta$  *sensu stricto*, BMPs, activinas e inibinas. Todas aparentam partilhar mais do que semelhanças sequenciais, sugerindo aspectos comuns nos seus mecanismos de sinalização *downstream* (Herpin *et al.* 2004).

## 1.2 Síntese de TGF- $\beta$ e Activação

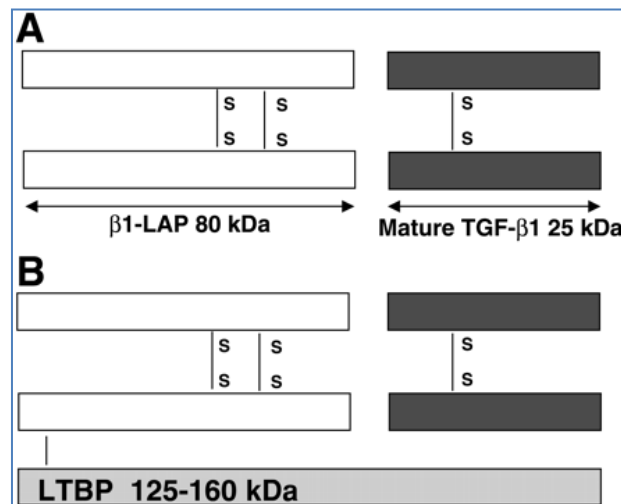
8

As isoformas do TGF- $\beta$  são codificadas sobre a forma de grandes proteínas precursoras com entre 390-412 aminoácidos de tamanho. Estas proteínas sofrem vários passos de processamento intracelular antes de serem secretadas pela célula. Destes, o mais importante passo parece ser a digestão proteolítica da proteína precursora pela furina endopeptidase, que cliva a proteína entre os aminoácidos 278 e 279, montando-os sobre a forma de dímeros. O dímero proteico de 65 –75-kDa da região N-terminal é chamado de péptido associado à latência (“*latency-associated peptide*”, LAP), enquanto um segundo dímero de 25-kDa da porção C-terminal é chamado de TGF- $\beta$  maduro. Apesar da clivagem do precursor ser algo comum entre todos os TGF- $\beta$ s, também é comum que a porção N-terminal continue ligada não-covalentemente após a clivagem. Esta associação entre LAP e TGF- $\beta$  maduro não só a mantêm biologicamente inactiva, como facilita o transporte para fora da célula (Khalil 1999).

A estrutura da LAP do TGF- $\beta$ 1 (LAP-1) está bem descrita. Cada LAP-1 contém resíduos carboidratos ligados pelo N-terminal, dois desses contendo grupos manose-6-fosfato que podem interagir com os receptores manose-6-fosfato/factores de crescimento *insulin-like* de tipo II que existem na superfície da célula. Existem três cisteínas em cada LAP-1, entre quais as cisteínas das posições 223 e 225 são importantes para dimerização dos monómeros de LAP através de ligações dissulfídicas entre cadeias. Quando as serinas são substituídas por cisteínas nas posições 223 e 225 da LAP-1, o TGF- $\beta$ 1 é secretado na sua forma activa, sugerindo que estas cisteínas são importantes na associação entre LAP-1 e TGF- $\beta$ 1. A terceira cisteína está na posição 33 e está envolvida na ligação a outra proteína, chamada de *latency binding protein* (LTBP). Quando L-TGF- $\beta$  está associada à LTBP, é denominada por TGF- $\beta$  latente grande, enquanto que a L-TGF- $\beta$  isolada é denominada de TGF- $\beta$  latente pequena. (Khalil 1999).



**Fig. 2. Modificações Pós-transcricionais da superfamília de ligandos TGF-β.** Um típico “ligando de TGF-β” é traduzido como um precursor preproteína. Após clivagem do sinal peptídico (SP), o precursor proteico resultante é clivado por uma convertase da furina. Dependendo do tipo de ligando, um dímero do péptido C-terminal é ou libertado livre ou associado com o pro-domínio N-terminal para formar um complexo indutor de latência que se liga a LTBP. Linhas inteiras: Ligações dissulfídicas; linhas a tracejado: interações não-covalentes; C – Resíduos de cisteína. Adaptado de (Moustakas and Heldin 2008).



**Fig. 3. Estrutura esquemática da TGF-β.** A proteína activa é mostrada em duas formas: com o pequeno complexo de latência, incluindo a proteína associada à latência (LAP; A) e no grande complexo de latência, ligado com a LBTP (B). Ligações dissulfídicas mantêm estes dois complexos (S-S). Adaptado de (Schnaper *et al.* 2003).

## 1.3 Receptores TGF- $\beta$

Apesar de toda a sua diversidade e da importância fisiológica da sua sinalização, os receptores dos membros da família TGF- $\beta$  são complexos heteroméricos com actividade cinase de serina/treonina de tipo I e tipo II, assim como também receptores tipo III sem domínios cinase (Herpin *et al.* 2004).

Esta família de receptores possui bastante homologia, e os seus membros são todas proteínas transmembranares que possuem domínios de ligação extracelulares pequenos e ricos em cisteína; um domínio transmembranar hélice  $\alpha$ , um longo domínio citoplasmático que consiste numa cinase; e em sequências proteicas adicionais que servem como aceitadores de fósforo ou locais de ancoragem para interacção com proteínas de sinalização. Com base nas suas propriedades funcionais e estruturais, a família de receptores TGF- $\beta$  é dividida em três subfamílias: os receptores de Tipo I, os receptores de Tipo II e os receptores de tipo III. Os receptores Tipo I e Tipo II são divididos em categorias conforme ligam activinas, BMPs ou TGF- $\beta$ s *sensu stricto* (Herpin *et al.* 2004; Moustakas and Heldin 2008).

Existem sete receptores Tipo I e cinco receptores Tipo II. Os sete receptores Tipo I são mais conhecidos como cinases semelhantes aos receptores de activina (“*activin receptor-like kinases*”, ALKs). Recebem um número de 1 a 7, cada um servindo as necessidades de sinalização de múltiplos ligandos da família TGF- $\beta$ . Os cinco receptores Tipo II incluem os dois receptores activina/BMP, - ActRIIA, ActRIIB – o receptor BMP, - BMPRII - o receptor TGF- $\beta$  e o receptor AMH - AMHRII (Moustakas and Heldin 2008). Existe um total de doze receptores que se organizam em diferentes conformações, resultando em diferentes arranjos e diferentes complexos, permitindo assim especificidade para os vários membros da família TGF- $\beta$  (Massague and Gomis 2006).

**Tabela 1. Ligandos, Receptores Tipo I, e Smads que participam nas vias de sinalização de superfamília TGF- $\beta$ .** Receptores de Tipo II não estão presentes na tabela. Os ligandos fisiológicos da ALK-1 e ALK-7 ainda não foram determinados, contudo, TGF- $\beta$  pode servir de ligando para ALK-1 em certas linhas celulares, incluindo células endoteliais.

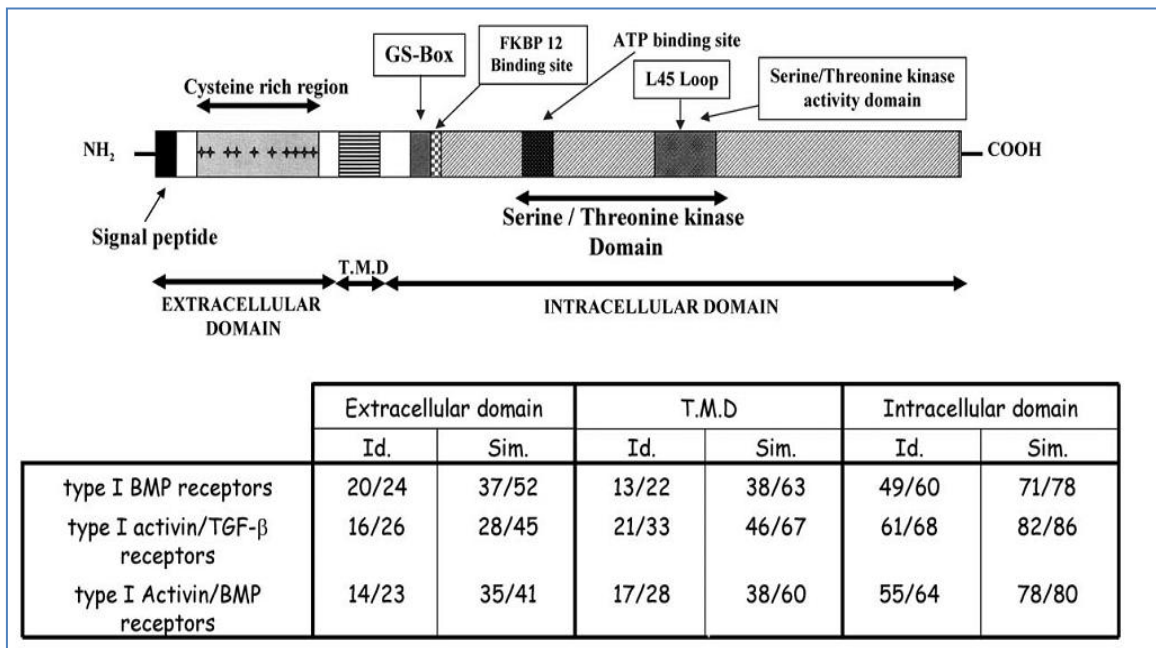
Ligandos	Receptores de Tipo I	R-Smads	Co-Smads	
OP1	ALK-3 (BMPR- IA)	Smad 1, 5, 8	Smad 4	
BMP-2/4				
GDF-5	ALK-6 (BMPR- IB)			
BMP-2/4				
OP1				
BMP-6	ALK-2 (ActR-I)			
OP1				
TGF- $\beta$	ALK-1 (T $\beta$ SRI)			
Activina	ALK-4 (ActR-IB)			Smad 2,3
TGF- $\beta$	ALK-5 (T $\beta$ RI)			
Desconhecido	ALK-7			

**Tabela 2. Receptores de Tipo II e Tipo III e os seus ligandos.**

Ligandos	Receptores de Tipo II	Receptores de Tipo III
BMP	BMPRII	Endoglina
	ActR-IIB	
	ActRII	
Activina	ActRII	
	ActRIIB	
TGF- $\beta$ 1	T $\beta$ RII	$\beta$ -glicano
TGF- $\beta$ 3		
TGF- $\beta$ 2		

Os receptores de Tipo I necessitam de estar associados em homo e heterodímeros para poder induzir especificidade à sinalização. A afinidade dos receptores de Tipo I isolado para ligandos é normalmente fraca e carece de especificidade. A formação de complexos entre diferentes subtipos de receptores de Tipo I e Tipo II permite definir a especificidade da via de sinalização. (Herpin *et al.* 2004).

Os receptores menos estudados são os receptores de TGF- $\beta$  de Tipo III, que são proteínas da família zona pelúcida (ZP), nomeadamente, o  $\beta$ -glicano e a endogлина. Tanto o  $\beta$ -glicano como a endogлина possuem grandes regiões extracelulares que se ligam ao TGF- $\beta$  e pequenas regiões citoplasmáticas. O  $\beta$ -glicano e a endogлина podem afectar a disponibilidade do TGF- $\beta$ , regulando como a molécula se liga aos receptores e determinando o resultado da estimulação pelo TGF- $\beta$ . Contudo, enquanto o  $\beta$ -glicano possui grande afinidade pelo TGF- $\beta$ 2, a endogлина mostra maior eficiência em interacções com o TGF- $\beta$ 1 e o TGF- $\beta$ 3. Apesar de não efectuarem sinalização, os receptores de Tipo III revelaram-se extraordinariamente importantes para a regulação da sinalização pelo TGF- $\beta$ .



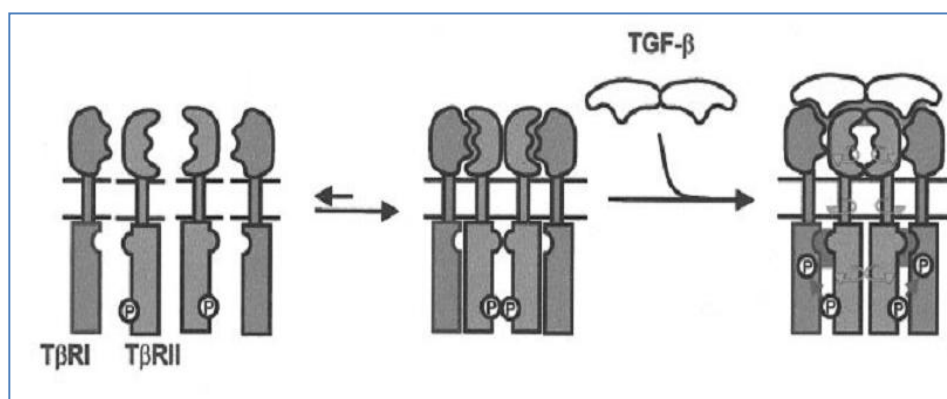
**Fig. 4. Um esquema simplificado dum protótipo de uma proteína receptora do Tipo I.** (A) Representação esquemática dum receptor do Tipo I indicando os domínios inteiramente conservados e funcionais. O domínio extracelular, de aproximadamente 150 aminoácidos, contém 10 ou mais cisteínas. Três dessas cisteínas foram um agregado característico (CCX4–5C) próximo do domínio transmembranar. Outra característica é a *GS box* (T/Q SSGSGGLP), assim chamada devido às repetições em *tandem* GS depois do centro do domínio cinase. A sequência do *loop* L45 no domínio cinase do T $\beta$ R-I determina a especificidade da actividade sinalizadora de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ s.s./Activinas ou BMPs). TMD: Domínio Transmembranar, ‘+’ representa cisteínas conservadas. (B) Percentagem de identidade mínima e máxima (Id) e similaridade (Sim) entre membros das diferentes classes de receptores de Tipo I. Adaptado de (Herpin *et al.* 2004)

## 1.4 Via de Sinalização da TGF- $\beta$

A maioria da sinalização da TGF- $\beta$  ocorre através de receptores cinase de serina/treonina Tipo I e II e os seus substratos, as Smads (ten Dijke and Hill 2004).

### 1.4.1. Receptores Cinase de Serina/Treonina – sinalização e regulação da TGF- $\beta$ na superfície celular

A sinalização por TGF- $\beta$  começa com ligação de TGF- $\beta$  a um receptor de Tipo II. Este complexa com receptores de Tipo I, provocando fosforilação do receptor e transmitindo o sinal. Estudos estruturais parecem indicar que TGF- $\beta$  se liga a um complexo pré-formado, induzindo reorientação conformacional entre as cadeias proteicas de dois receptores e a activação das cinases (Fig.5) (Atfi *et al.* 1995; Zhu and Burgess 2001).



**Fig. 5. Activação do receptor da TGF- $\beta$  através da orientação do receptor.** Existe um equilíbrio entre os receptores monoméricos e os receptores complexos. Ligação de ligando força uma reorientação entre os receptores de Tipo I e II (rotação relativa). Esta reorientação permite interações produtivas entre os domínios de cinase, formando um complexo receptor activo. Adaptado de (Zhu and Burgess 2001).

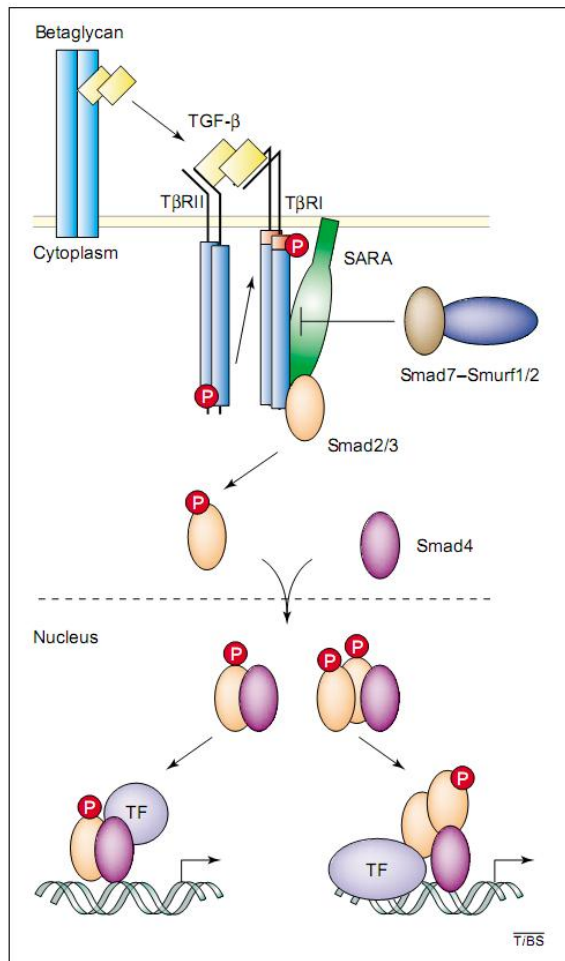
No estado basal (latente, inactivo) o receptor de Tipo II de TGF- $\beta$  é fosforilado na ausência de um ligando, uma vez que esta é uma cinase constitutivamente activa. A ligação de TGF- $\beta$  permite ao receptor de Tipo II fosforilar/activar o receptor de Tipo I, que de seguida activa os substratos. Vários mecanismos existem para induzir a latência dos receptores. Um destes mecanismos parece ser a justaposição dos domínios extracelulares do receptor. A orientação basal previne a fosforilação do receptor de Tipo I pelo receptor de Tipo II. Na presença de TGF- $\beta$ , o receptor de Tipo II activa o receptor de Tipo I por fosforilação do domínio, o que indica que o bloqueio do domínio GS é outra forma de

manter o complexo no estado basal. FKB12 liga-se ao domínio GS e bloqueia a fosforilação dos locais de activação, impedindo que a cinase se aproxime do domínio GS. Contudo, a reorientação causada pela TGF- $\beta$  pode causar a libertação de FKBP12, permitindo a activação do complexo. (Zhu and Burgess 2001).

#### 1.4.2. Smads - sinalização e regulação da TGF- $\beta$ da superfície celular até ao núcleo

As Smad são responsáveis pela propagação do sinal, através do citoplasma até ao núcleo. Com base nas suas propriedades estruturais e funcionais, Smads podem cair numa de três subclasses. A primeira classe consiste nas Smad que actuam como substratos directos dos receptores da família TGF- $\beta$  e são denominadas de Smads reguladas por receptores ou **R-Smads**. A segunda classe inclui Smads que não são substratos directos dos receptores, mas cuja função é essencial para a sinalização de TGF- $\beta$ , chamadas de “**co-Smads**”, como é o caso da Smad4. A terceira e última classe inclui as Smads antagonistas, que nos vertebrados são representadas por Smad 6 e 7. Estas Smads inibidoras, chamadas de **Anti-Smad** ou **I-Smad** apenas conservam o domínio MH2 (Hata *et al.* 1998).

As proteínas Smad têm uma estrutura de domínios altamente conservados, nomeadamente, dois domínios, um C-terminal e um N-terminal, conhecidos por “*Mad homology domains*” 1 e 2 (MH1 e MH2), unidos por uma região de tamanho e constituição variável. No estado basal as proteínas Smad formam homooligómeros, com os três domínios mantendo a interacção entre diferentes proteínas. As Smad reguladas pelos receptores e as Smad4 possuem capacidade de ligação ao ADN directa no domínio MH1, mas a contribuição relativa do domínio MH1 para a ligação ao ADN pode variar conforme o gene alvo. Nas Smads reguladas por receptores, o domínio MH2 actua como mediador na associação entre Smads. O domínio MH2 tem função efectora, apresentando actividade transcritora mesmo quando isolado. Os domínios MH1 e MH2 são mutuamente inibitórios, esta inibição devendo-se provavelmente à interacção física entre os dois domínios (Hata *et al.* 1998; Massague and Chen 2000).



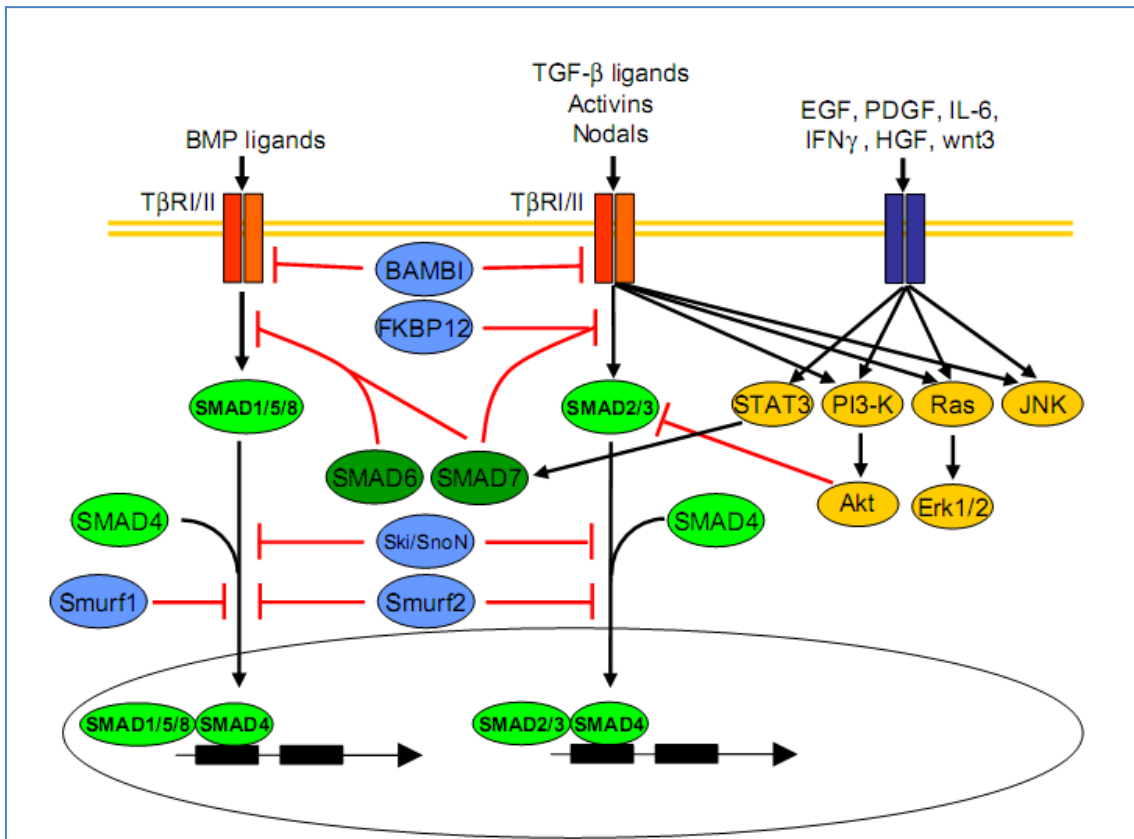
**Fig. 6. A via de sinalização canónica TGF- $\beta$ -Smad.** Receptores acessórios, como o betaglicano homodimérico (ciano), podem apresentar TGF- $\beta$  aos receptores. O receptor constitutivamente activo de TGF- $\beta$  de Tipo II (T $\beta$ RII; azul) fosforila o receptor de TGF- $\beta$  de Tipo I (T $\beta$ RI; azul) em resíduos de serina e treonina específicos no domínio GS (região vermelho pálido). T $\beta$ RI activado propaga o sinal “downstream” através de fosforilação directa das Smad 2 e 3 (laranja), que podem ser apresentadas ao T $\beta$ RI por proteínas de “scaffolding” como SARA (green). Smad2 e Smad3 foram complexos heterotriméricos ou diméricos com Smad4 (púrpura), que em combinação com factores de transcrição (lilás), regulam a transcrição genética. Complexos de Smad 7 (castanho) e Smurf1 ou Smurf2 (azul escuro) actuam como mediadores da terminação do sinal através da promoção da poliubiquitinação e degradação dos receptores activados. TF, factor de transcrição. Adaptado de (ten Dijke and Hill 2004).

Durante o processo de sinalização, as Smads interagem com diferentes componentes da via, estas interacções provocando o inicio da sequência de eventos. No citoplasma, Smad 2 e Smad 3 interagem com SARA e o receptor de tipo I antes e depois da fosforilação, mas apenas depois de formar um complexo com Smad4 é que são libertados por SARA/Receptor Tipo I e se acumulam no núcleo. Esta libertação ocorre porque as mesmas interacções necessárias para ligar à região GS do receptor de Tipo I são necessárias para a formação do complexo Smad2-Smad4. O mesmo acontece com o domínio das SARA responsável pela ligação às Smads. Estas condições asseguram que a formação do complexo R-Smad/Co-Smad é o despoletar da migração nuclear (ten Dijke and Hill 2004).

À medida que as Smad se acumulam no núcleo, elas podem interagir com factores de transcrição que as recrutam para elementos específicos dos promotores dos genes alvos. Um dos primeiros factores de transcrição com interacção com Smads a ser descoberto foi XFast1, da família *Xenopus* FoxH1. A sua descoberta permitiu determinar um motivo de interacção com Smads rico em prolinas e bem conservado que é “*Smad interaction motif*” (SIM). O SIM pode interagir com os domínios MH2 de Smad2 e Smad3, permitindo assim

recrutar o complexo activo para o ADN. O SIM tem grande homologia sequencial com o domínio de SARA responsável pela ligação às Smads. Contudo, apesar dos dois serem motivos ricos em prolinas, o tamanho do SIM e o local de interacção com as Smad mais distanciado do interface de conjugação Smad-Smad, garantem que o SIM tem maior afinidade para Smads complexados, enquanto SARA possui mais afinidade com Smads isolados (ten Dijke and Hill 2004).

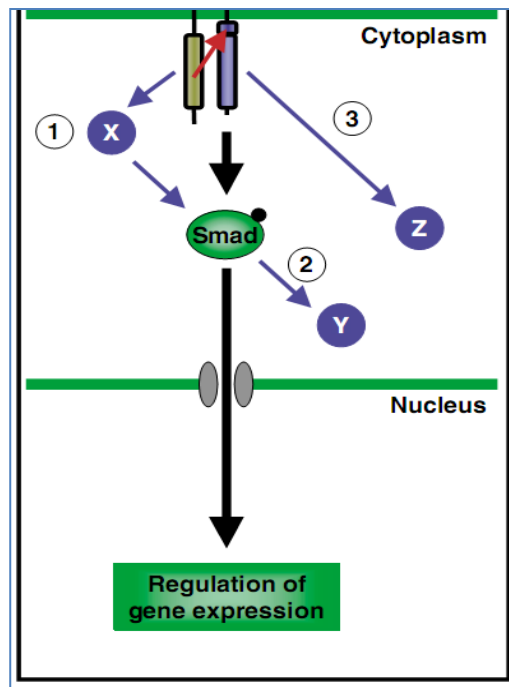
Algo similar acontece durante a translocação do complexo de Smads entre o citoplasma e o núcleo, uma interacção directa entre as Smads e as nucleoporinas, nomeadamente, Nup214 e Nup153. Notavelmente, o local de ligação destas nucleoporinas está localizado no domínio MH2 das Smads, sobrepondo-se aos locais de ligação para o domínio ligante da SARA e do SIM, assegurando que estas interacções são mutuamente exclusivas. Isto parece indicar que sinalização por Smad é propaganda de receptor até ao núcleo através do poro nuclear por meio de uma série de interacções competitivas proteína-proteína (ten Dijke and Hill 2004).



**Fig. 7. A complexa via de sinalização por TGF- $\beta$ .** Os ligandos da superfamília TGF- $\beta$  ligam e ativam complexos receptores, resultando na ativação *downstream* de vias Smad e Não Smad. Outras vias de sinalização, como factores de crescimento e vias de citocinas realizam “*cross-talk*” com a via das TGF- $\beta$ , resultando na ativação ou desativação de estruturas fulcrais para a sinalização pela via das TGF- $\beta$ . A via de sinalização das TGF- $\beta$  é fortemente regulada em todos os seus passos. BAMBI = *BMP and activin membrane-bound inhibitor*; BMP = *bone morphogenetic protein*; EGF = *epidermal growth factor*; HGF = *hepatocyte growth factor*; IFN- $\gamma$ , Interferão Gama; IL = Interleucina; JNK = Cinase Jun N-terminal; STAT = *signal transducers and activator of transcription*; PI3-K = Fosfoinositídeo 3-quinase. Adaptado de (Luwor et al., 2008).

## 1.5 Vias de Sinalização TGF- $\beta$ Não Smad

A via de sinalização das Smad representa um módulo de sinalização com grande conservação evolutiva que transmite sinais para o núcleo e é essencial para a precisa função de tecidos e órgãos, assegurando que o seu desenvolvimento é o correcto. As vias de sinalização independentes das Smad (também denominadas de vias Não Smad) possuem um papel menos claro e não se possui uma ideia concreta da sua significância, mas investigação actual e passada começaram a revelar os mecanismos usados por estas vias para influenciar a regulação genética e celular (Moustakas and Heldin 2005).



**Fig. 8. Esquema da sinalização Não Smad.** A sinalização canónica por Smads começa no complexo ligando-receptor e termina no núcleo, aqui demonstrada pelas setas negras. Sinalização Não Smad segue os mecanismos mostrados pelas flechas azuis. O complexo receptor activa (por interacção e/ou fosforilação) a proteína X, que depois modula a actividade da Smad (1). A Smad fosforilada activa (por interacção) a proteína Y, que por sua vez transmite mais sinais à célula (2). O complexo receptor activa (por interacção e/ou fosforilação) a proteína Z, que por sua vez transmite sinais sem fazer “*cross-talk*” directo com a via das Smads (3). Proteínas X, Y e Z podem ser enzimas (ex: cinases lipídicas ou proteicas) ou proteínas adaptadoras. Adaptado de (Moustakas and Heldin 2005).

A existência de proteínas que participam na sinalização do TGF- $\beta$  foi provada antes da descoberta das Smad. Diferentes experiências implicaram o envolvimento de GTPase Ras e “*mitogen-activated protein kinases*” (MAPKs) ERKs, p38 e cinases N-terminal de c-Jun (JNKs) na sinalização de TGF- $\beta$  (Yue and Mulder 2001; Moustakas and Heldin 2005).

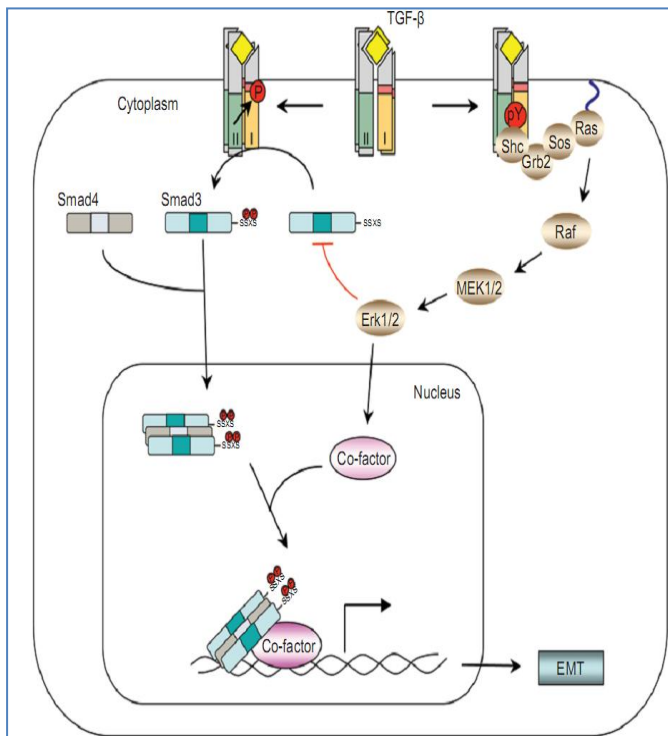
A suposta interacção das vias independentes de Smad com as MAPKs é a base deste estudo, que tenta elucidar como interagem as duas vias de sinalização.

### 1.5.1. Activação da via de sinalização das ERK/MAPK por TGF- $\beta$

A via das MAPK é um dos mais importantes sistemas de sinalização usado por células eucarióticas para a transdução de sinais extracelulares para respostas intracelulares. Activada por uma cascata coordenada de três reacções de cinases de proteínas que transmitem sinais por fosforilação sequencial e activação de outras cinases da via de sinalização. Como acontece nas vias de sinalização dos TGF- $\beta$ , as cascatas das MAPK estão implicadas em papéis fulcrais para a regulação do crescimento celular, diferenciação, apoptose e respostas celulares a stress ambiental (Seeger and Krebs 1995; Chin *et al.* 2001).

A cinética da fosforilação da ERK – cinase regulada por sinais extracelulares (“*extracellular sinal-regulated kinase*”) – induzida pelo TGF- $\beta$  varia com o tipo celular e com as condições de cultura. Em algumas células, como por exemplo, as células epiteliais, as células do cancro da mama e os fibroblastos, existe uma rápida activação. Em outras linhas celulares, o pico de fosforilação ocorre horas depois da estimulação pelo ligando, sugerindo um resposta indirecta que requer tradução proteica (Zhang 2009).

Na tradicional via das MAPK/Ras/ERK, o receptor fosforilado RTK (“*receptor tyrosine kinase*”) atrai o Grb2 (“*growth factor receptor binding protein 2*”) sob a forma de um complexo Grb2/Sos. Este complexo activa Ras, que por sua vez activa Raf, activando uma via de sinalização que inclui ERKs e MEKs (Seger and Krebs 1995; Zhang 2009).



**Fig. 9. A via de sinalização Não Smad das ERK.** TGF- $\beta$  pode induzir a fosforilação de resíduos de tirosina em ambos os tipos de receptors, I e II e/ou em Shc. As tirosinas fosforiladas são capazes de recrutar Grb2/Sos para activar ERK através de Ras, Raf e a sua cascata MAPK “*downstream*”. Posteriormente, ERK regula a transcrição génica através dos seus factores de transcrição *downstream* em conjunto com Smads para controlar EMT – transição epitelial para mesênquimal (“*epithelial to mesenchymal transition*”). ERK pode também inibir as actividades das R-Smad através da fosforilação das mesmas. Adaptado de (Zhang 2009).

O receptor de Tipo II do TGF- $\beta$  pode sofrer autofosforilação em três resíduos de tirosina, ou pode ser fosforilado por Src – uma não-RTK, – criando um local de ancoragem para o recrutamento de Grb2 e Shc. Isto implica a existência de semelhança entre a activação do receptor tipo II do TGF- $\beta$  e a via de sinalização das MAPK. O receptor do TGF- $\beta$  de Tipo I também pode ser fosforilado mediante activação pelo TGF- $\beta$ , tornando-se capaz de recrutar ShcA e promover a formação de um complexo Shc/Grb2/Sos capaz de activar Ras a nível da membrana plasmática, começando assim a activação sequencial de c-Raf, MEKs e ERKs. Parece que Shc desempenha um papel crucial na activação da ERK induzida pelo TGF- $\beta$ , assim como tudo indica que o recrutamento das vias de sinalização

da cinase de tirosina é um dos mecanismos moleculares pela qual o TGF- $\beta$  activa sinalização Não Smad (Schlessinger 2000; Lee *et al.* 2007; Zhang 2009).

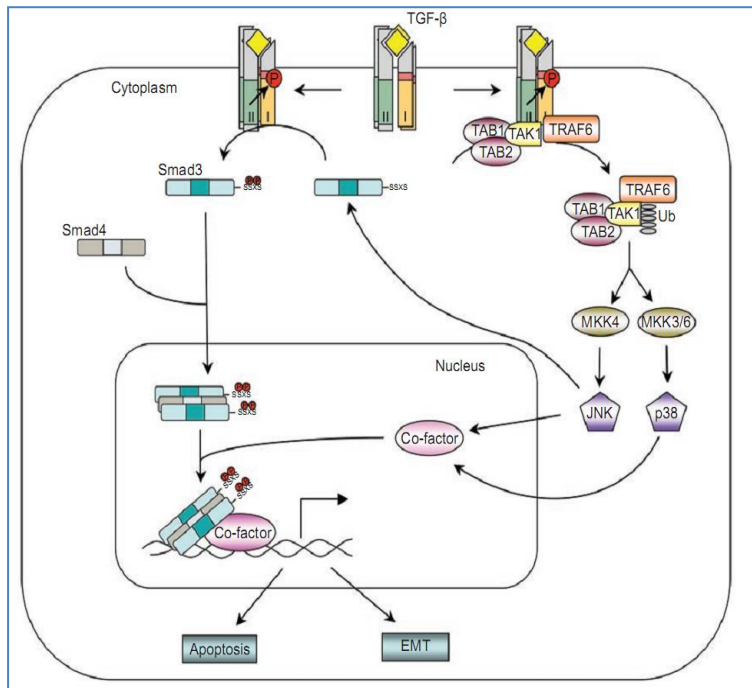
### 1.5.2. Activação das vias de sinalização MAPK JNK/p38 por TGF- $\beta$

JNK e p38 são activadas por MKKS – cinases de MAP cinases (“*MAP kinase kinases*”). Em várias linhas celulares, o TGF- $\beta$  pode activar a JNK através de MKK4 e a p38 através de MKK 3/6. Alguns investigadores provaram que a activação da JNK e da p38 induzida pelo TGF- $\beta$  ocorre mesmo na ausência de Smads, provando que este efeito se dá por uma via de sinalização de TGF- $\beta$  Não Smad (Zhang 2009).

As MKKs podem activar JNK e p38, mas *upstream*, as MKKs são activadas por MAP3Ks. No caso das MKK3/6 e MKK4, a cinase activada por TGF- $\beta$  1 (“*TGF- $\beta$ -activated kinase*”, TAK1) é uma das responsáveis pela activação de MAP3Ks. A TAK1 é de extrema importância fisiológica, uma vez que embriões deficientes em TAK1 demonstram defeitos vasculares, um fenótipo bastante semelhante aquele exibido nas mutações causadoras de perda de função dos genes que codificam o receptor de Tipo I ALK ou o receptor de tipo III endoglina. Além disso, o TGF- $\beta$  é absolutamente necessário para activação de JNK e p38 induzida pela via dos TGF- $\beta$  (Shim *et al.* 2005; Jadrich *et al.* 2006; Zhang 2009).

De modo a activar a TAK1, o TGF- $\beta$  interage com a TRAF6. A TRAF6 desempenha um importante papel na activação de TAK1 pelo receptor de interleucina 1 e na via de sinalização mediada pelos TLRs (“*Toll-like receptors*”). Sendo activador da TAK1, não é de estranhar que a TRAF6 seja crucial para activação da via de sinalização TAK1-JNK/p38 induzida pelo TGF- $\beta$ . Tal com outras proteínas TRAF, a TRAF6 é composta por domínio C-terminal bastante conservado e um domínio com mais aminoácidos variáveis que contêm um “*RING finger*” E3 ligase e vários “*zinc fingers*”. Após poliubiquitinação pela poliubiquitina associada a K63, a TRAF6 recruta TAK1 e despoleta a sua activação, assim permitindo que a TAK1 active posteriormente as vias das JNK/p38. Para além da TAK1, outras duas MAP3Ks, a MEKK1 e a MLK3 foram propostas como mediadores “*upstream*” da activação da JNK ou da p38 induzida pela TGF- $\beta$  via MKK4 ou MKK3/MKK6 respectivamente. Não se sabe se a TRAF6 ou outras TRAFs estão envolvidas nesta activação (Bradley and Pober 2001; Shim *et al.* 2005; Zhang 2009).

Esta via de sinalização Não Smad TRAF6-TAK1-JNK/p38 desempenha um papel crucial na EMT e na apoptose induzida por TGF- $\beta$ .



**Fig. 10. A via de sinalização Não Smad JNK/p38.** Receptores TGF- $\beta$  interagem com TRAF6 e induzem a formação de cadeias de poliubiquitina associadas a K63 em TRAF6. TRAF6 poliubiquitinada recruta TAK1 para ativar JNK/p38. A JNK/p38 activada actua em conjunção com Smads para regular apoptose e EMT por control dos factores de transcrição "downstream". JNK pode também regular actividade das R-Smad directamente por fosforilação. Adaptado de (Zhang 2009).

## 1.6 Sinalização cruzada com outras vias

Para além das vias de sinalização Smad e Não Smad, a TGF- $\beta$  também influencia e é influenciada por vários sinais intracelulares e extracelulares, dando  sinalização por TGF- $\beta$  maior complexidade.

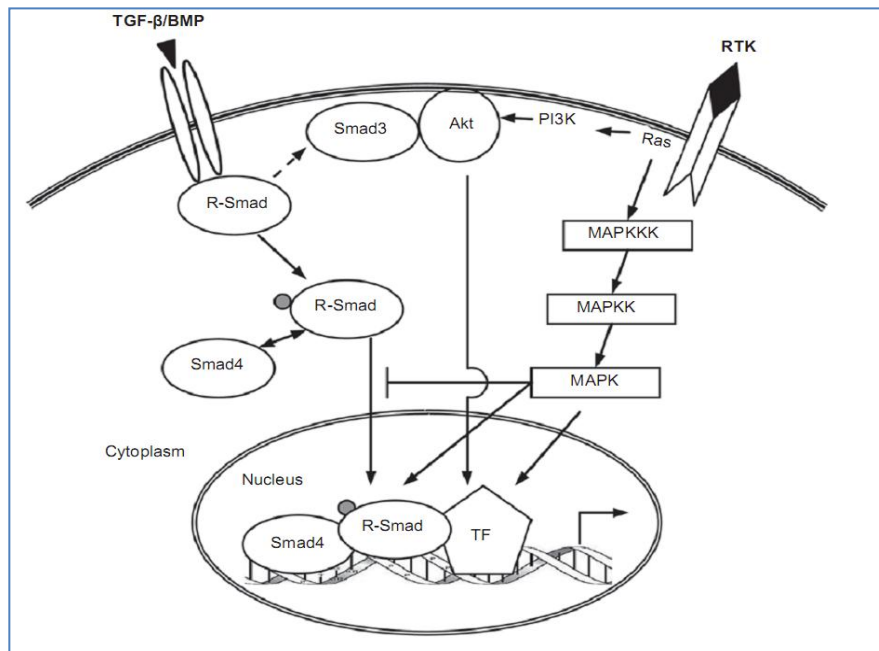
### 1.6.1. Sinalização cruzada com a via de sinalização das MAPK

Como foi anteriormente apontado, o TGF- $\beta$  utiliza as vias de sinalização das JNK/p38 e ERK para sinalização Não Smad. A sinalização pelas MAPKs consiste numa série de fosforilações, começndo a cascata com a fosforilação da cinase de cinase de MAP cinase ("MAP kinase kinase kinase", MAPKKK), seguindo-se cinase de MAP cinase ("MAP kinase kinase", MAPKK) e finalmente a MAP cinase ("MAP kinase", MAPK). As MAPKs regulam várias proteínas através de fosforilação, regulando assim processos de proliferação, sobrevivência, migração, e outros processos (Chang and Karin 2001; Guo and Wang 2009).

Um dos mais conhecidos iniciadores da via MAPKs  activação da Ras, que propaga sinais de RTKs e regula várias vias, como a via HER2/Neu/ErbB2 pathway. A via de sinalização HER2/Neu/ErbB2, que activa tanto a via MAPK como a cinase do fosfato

(“*phosphate dylinositol-3 kinase*”, PI3K/Akt), comunica intimamente com TGF- $\beta$ /Smad no controlo da biologia das células epiteliais em mamíferos e o desenvolvimento do cancro da mama. A noção geral que emerge é que HER2/Ras pode antagonizar a apoptose induzida por TGF- $\beta$  e o bloqueio do ciclo celular, o que permite que TGF- $\beta$  actue de forma pró-migratória e pró-invasiva. Regulações tanto negativas como positivas cruzam-se entre ambas as vias de sinalização (Chang and Karin 2001; Guo and Wang 2009).

Vários estudos revelaram que a região de interacção com o ligando das proteínas Smad é uma plataforma crítica para a integração de sinais RTK/ MAPK na via de sinalização TGF- $\beta$ /BMP. Esta região possui pouca organização estrutural, carecendo de motivos únicos e é bastante flexível, o que a deixa prontamente acessível para um grande número de cinases. Esta região também é rica em resíduos de serina, treonina e prolina, favorecendo a fosforilação destes resíduos, como as MAPK (Seton-Rogers *et al.* 2004; Guo and Wang 2009).



**Fig. 11. Cross-signaling das vias da TGF- $\beta$ , MAPK e PI3K/Akt.** As vias de sinalização MAPK e modular as vias da TGF- $\beta$ /BMP através da modulação das funções de Smad. MAPKs e Akt também fosforilizam uma variedade de ligandos nucleares da Smad, indirectamente afectando as Smads. Adaptado de (Guo and Wang 2009).

As MAPKs podem fosforilar Smads, no núcleo ou no citoplasma, e a regulação pode ter resultados diferentes, dependendo da natureza da cinase, a localização intracelular específica onde ocorre a fosforilação, eventos colaterais causados pela activação da MAPK e outros factores específicos do tipo celular. Para além das R-Smads, MAPKs podem também regular e fosforilar a Co-Smad Smad 4 e a Smad inibidora. Adicionalmente, as

MAPKs fosforilam um número de factores de transcrição, muitos dos quais podem interagir fisicamente com Smads e regular as respostas TGF- $\beta$ /BMP, adicionando outra série de sinalizações cruzadas entre as duas vias (Guo and Wang 2009).

### 1.6.2. Sinalização cruzada com a via PI3K/Akt

A função mais estudada da PI3K é a conversão do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 é uma ponderosa molécula de sinalização que regula um vasto número de efectores, sendo o mais importante a cinase de serina/treonina Akt. A RTK/Ras, a integrina e outros sinais podem activar a fosforilação da via das PI3K/Akt, que normalmente promovem a sobrevivência celular, o crescimento e a mobilidade (Guo and Wang 2009).

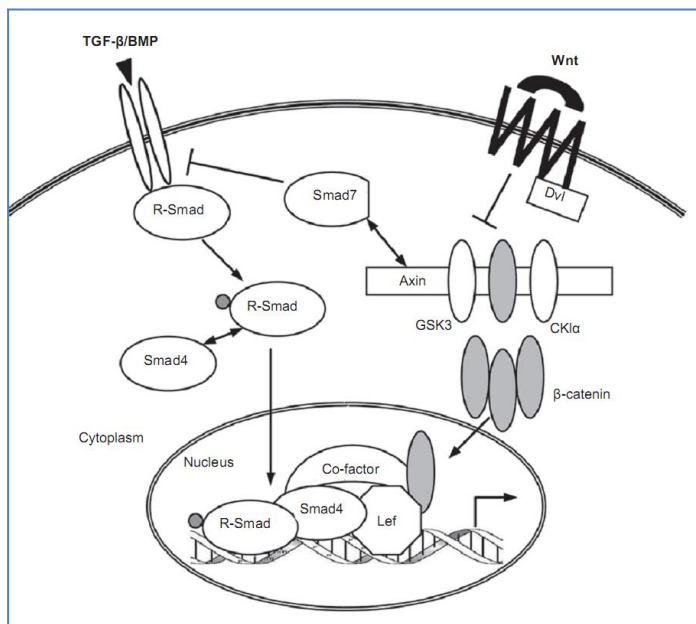
Sabe-se que a actividade da PI3K/Akt atenua a apoptose/bloqueio do ciclo celular induzido pelo TGF- $\beta$  em vários tipos celulares, em resposta a factores como a insulina, a IGF, a interleucina 6 e interacções virais. Como PI3K/Akt modula a activação da Smad 3 é uma questão que continua sem resposta. A via de sinalização PI3K/Akt também é sujeita a regulação por TGF- $\beta$ /BMP, uma vez que a actividade de Akt aumenta em resposta a tratamento com TGF- $\beta$ , mas deve-se notar que a activação de Akt por TGF- $\beta$ /BMP depende das células e é provavelmente indirecta, normalmente requerendo MAPKs ou acções autocrinas de diferentes moléculas. Por outro lado, a via das PI3K/Akt ser regulada por TGF- $\beta$ /BMP: a actividade de PI3K é reduzida pela proteína supressora de tumores PTEN, que por sua vez é regulada negativamente pelo TGF- $\beta$  a nível transcricional, novamente através de sinalização cruzada com a via das Ras/MAPK (Siegel *et al.* 2003; Chow *et al.* 2007; Guo and Wang 2009).

### 1.6.3. Sinalização cruzada com a via das Wnt

As proteínas Wnt são moléculas de sinalização que possuem diversos papéis na regulação da proliferação celular, da diferenciação, da migração, e da sobrevivência, entre outros. A sinalização canônica Wnt é mediada pelo factor de transcrição  $\beta$ -catenina, que sofre tráfego nucleocitoplasmático e é essencial para a formação de junções aderentes entre células através da sua interacção com caderinas (Guo and Wang 2009)

24

As sinalizações cruzadas entre as vias TGF- $\beta$ /BMP e Wnt são conhecidas há bastante tempo e provavelmente são algumas das mais extensivamente estudadas. As duas vias cruzam-se em vários eventos durante a vida do organismo e, molecularmente, interagem a vários níveis. Primeiro, TGF- $\beta$ /BMP e Wnt regulam reciprocamente a produção dos seus ligandos, o que é crítico para estabelecer gradientes extracelulares durante o desenvolvimento embrionário. Em segundo lugar, o maior local onde ocorre sinalização cruzada TGF- $\beta$ /Wnt é no núcleo, onde complexos Smad/ $\beta$ -catenina/proteína Lef regulam uma série de genes, muitas vezes de forma sinérgica. Terceiro e último ponto, algumas investigações recentes identificaram interacções citoplasmáticas entre componentes destas vias de sinalização como novos mecanismos que permitem regulação mútua. De facto, estas interacções cruzadas conservam-se entre espécies, evidenciando a importância biológica da sinalização integrada TGF- $\beta$ /Wnt (Guo and Wang 2009).



**Fig. 12. Sinalização cruzada entre as vias da TGF- $\beta$  e Wnt.** A sinalização cruzada entre TGF- $\beta$ /Wnt ocorre no núcleo, onde Smad e Lef/ $\beta$ -catenina sinérgicamente regulam um conjunto comum de genes alvo. TGF- $\beta$ /BMP e Wnt podem determinar a produção de ligandos uma da outra. Adicionalmente, interacções proteicas no citoplasma (como a ligação Smad7-axina) podem cruzar as duas vias de sinalizações em outras condições. Adaptado de (Guo and Wang 2009).

## 1.7. Papel biológico da TGF- $\beta$

O TGF- $\beta$  e a sua larga família expandiram-se e evoluíram com os vertebrados. Adquiriram complexas funções, acompanhando o aumento da complexidade biológica e ganhando um papel crucial em vários processos, como: a regulação e diferenciação de tecido neural e epitelial, a formação do sistema imunitário e os mecanismos de reparação e regeneração de tecidos, entre outros. O papel biológico do TGF- $\beta$  continuou a acompanhar-nos durante a nossa evolução, tornando-se cada vez mais complexo. Quando a delicada e complexa regulação por TGF- $\beta$  falha, várias anormalidades biológicas ocorrem (Massague 2008).

Muitos dos processos que regulam a homeostase, tanto a nível tecidual como no organismo, envolvem mais do que a via canónica da TGF- $\beta$ . A sinalização por MAPKs regula, tal como TGF- $\beta$ , a proliferação, a migração, a sobrevivência e a morte celular. Entender como estas duas famílias de vias de sinalização se cruzam e como são reguladas é fulcral para compreender os efeitos delas sobre o funcionamento normal e patológico do organismo. Sendo assim, indicaremos dois dos processos nos quais o papel dualista desta sinalização é mais evidente: o cancro e a fibrose.

### 1.7.1. Cancro

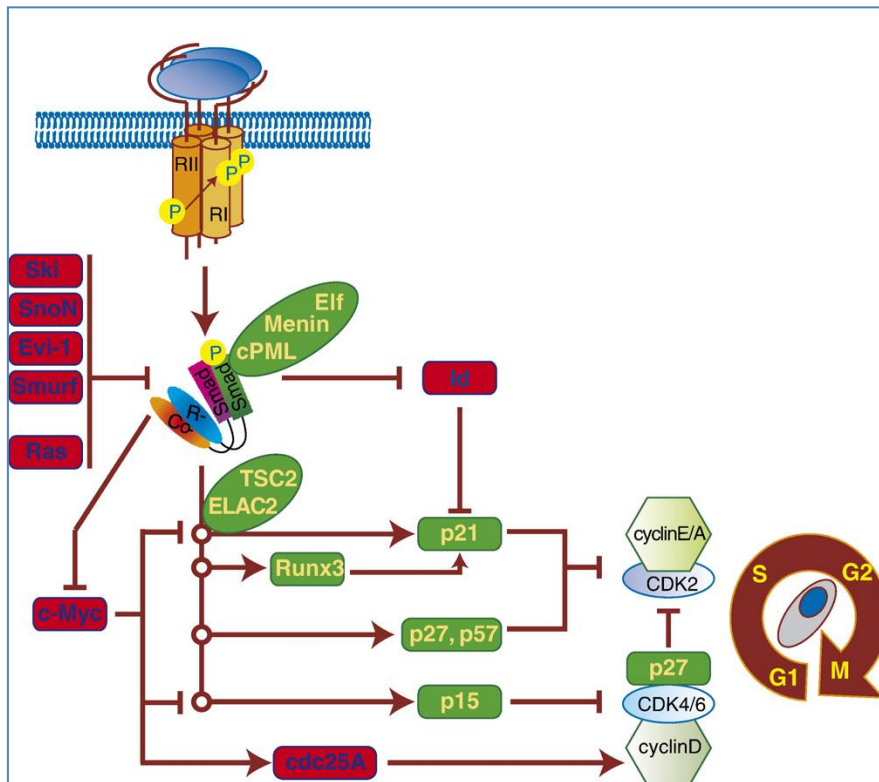
Os papéis complexos do TGF- $\beta$  durante a progressão de cancro envolvem esta via de sinalização em mudanças da fisiologia normal das células que caracterizam células tumorais. O TGF- $\beta$  indirectamente promove auto-suficiência em termos de sinais de crescimento, uma vez que é sobreexpressa por células cancerígenas e induz a produção de vários factores mitogénicos.

A via dos TGF- $\beta$ s sofre várias mutações em células tumorais que resultam em proteínas sem função. A inactivação da via dos TGF- $\beta$ s protege crescimento tumoral da sua acção citostática e indutora da apoptose.

Outra hipótese para o papel do TGF- $\beta$  em tumores sugere que sinais do TGF- $\beta$  são libertados para o ambiente estromal, afectando fibroblastos, miofibroblastos, a vascularização e a resposta a células do sistema imunitário. Estas interações promovem a sobrevivência tumoral, invasividade, angiogénese e metastificação de cancros de estágio avançado (Elliott and Blobel 2005; Levy and Hill 2006; Pardoll and Moustakas 2007).

### 1.7.1.1 TGF- $\beta$ como supressor tumoral

O TGF- $\beta$  pode parar o ciclo celular das células epiteliais, endoteliais e hemetopoéticas na fase G1 do ciclo, através da regulação da transcrição mediada por Smads. O TGF- $\beta$  também pode inibir a c-Myc e manter a pRb (proteína do retinoblastoma) no estado hipofosforilado, inibindo a proliferação celular. É possível que Smad3 e Smad4 sejam capazes de formar um complexo com uma proteína co-repressora e ligar a um elemento inibitório da transcrição do promotor de c-Myc (Pardali and Moustakas 2007; Massague 2008).



**Fig. 13. A resposta citoestática à sinalização TGF- $\beta$ /Smad.** O receptor TGF- $\beta$  activa a sinalização por Smads que induz directamente (nodos circulares) a transcrição de genes *downstream*: p21, Runx3, p27, p57 e p15, ou reprime a transcrição de c-Myc e Id. Componentes oncogénicos ou anti-citotáticos são mostrados em vermelho, enquanto os factores supressores de tumores ou anti-citotáticos são mostrados a verde. Adaptado de (Pardali and Moustakas 2007).

A via de sinalização do TGF- $\beta$  afecta directamente componentes da maquinaria do ciclo celular. O supressor de tumores p 53 liga-se a sequências específicas da região 5' pré-tradução do mRNA de CDK4. No entanto, o mecanismo pelo qual a sinalização TGF- $\beta$ /Smad instrui a p53 para agir como um repressor da tradução continua por elucidar. O

TGF- $\beta$  também controla os processos de tradução e pós-tradução dos inibidores do ciclo celular (“*cell cycle inhibitors*”, CKIs) das famílias Ink4 e Kip/Cip, bloqueando a transição entre fase G1 e S (Pardali and Moustakas 2007).

### 1.7.1.2 TGF- $\beta$ como um promotor tumoral

Um dos enigmas centrais da via de sinalização do TGF- $\beta$  é o porquê da sobreexpressão de TGF- $\beta$  bioactivo em tumores avançados, quando este parece ter um efeito inibitório sobre o crescimento celular e a proliferação. Descobriu-se cedo que células tumorais e linhas celulares expressam mais TGF- $\beta$ 1 que células normais. Expressão abundante do TGF- $\beta$ 1 parece ter correlação com fibrose nos pulmões e nos fígados. Níveis elevados do TGF- $\beta$ 1 estão associados a metástase e neovascularização em diversos tipos de tumores. Em tumores da próstata existe uma correlação entre perda de expressão do T $\beta$ RII com o grau de malignidade, invasividade tumoral e potencial metastático, assim como a expressão do TGF- $\beta$ 1. (Anscher *et al.* 1993; Walker *et al.* 1994; Ito *et al.* 1995; Hasegawa *et al.* 2001).

Enquanto o TGF- $\beta$ 1 é a isoforma mais comum de marcador da progressão tumoral em humanos, certos tipos de tumores sobreexpressam TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Contudo, o TGF- $\beta$  *per se*, não é o único membro da família que sofre sobreexpressão tumoral. Níveis elevados de BMPs podem ser detectados em tumores ósseos agressivos, no carcinoma do esófago, em adenocarcinomas da próstata e em carcinomas do pulmão. Mais estudos podem implicar outros membros da superfamília TGF- $\beta$  no processo de progressão tumoral, assim como múltiplos ligandos que podem permitir um método de prognóstico da doença. Mais informação sobre vias de sinalização alternativas, mecanismos de regulação e o papel de receptores menos estudados sobre a progressão tumoral podem fornecer potentes ferramentas de análise clínica e terapêuticas (Krasagakis *et al.* 1998; Ghellal *et al.* 2000; Pardali and Moustakas 2007).

### 1.7.2. Fibrose

Como foi anteriormente referido, o TGF- $\beta$  está envolvido na regulação de efeitos fisiológicos em células epiteliais e fibroblastos, provocando efeitos que podem conduzir ao desenvolvimento de fibrose. O TGF- $\beta$  pode promover a apoptose epitelial, produção de matriz extracelular, a migração celular, a proliferação celular e aumentar a síntese de colagénio e induzir transdiferenciação em miofibroblastos. Além disso, o papel do TGF- $\beta$  sobre a fibrose idiopática pulmonar foi bem descrito, uma vez que a expressão do TGF- $\beta$  é aumentada em amostras de tecidos tanto humanos como animais. Adicionalmente, supressão de TGF- $\beta$ , de ALK5 e de Smad3 tende a reduzir a fibrose pulmonar, ou até proteger contra esta. (Coker *et al.* 2001; Prud'homme 2007; Goodwin and Jenkins 2009).

O TGF- $\beta$  pode ser activada por integrinas, que são proteínas transmembranares heterodiméricas que possuem subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . As integrinas são capazes de ligar-se a proteínas da matriz extracelular, assim como a outras moléculas, incluindo ligandos da superfície celular, proteínas transmembranares, proteases solúveis e factores de crescimento. A integrina  $\alpha v \beta 6$  parece ser sobreexpressa na fibrose pulmonar, mas é incapaz de causar fibrose isolada. Isto sugere que a  $\alpha v \beta 6$  pode induzir sobreexpressão de TGF- $\beta$ , mas  $\alpha v \beta 6$  precisa de ser activada antes de poder activar TGF- $\beta$ . A activação desta integrina parece depender de mudanças do citoesqueléto. A integrina  $\alpha v \beta 8$  também parecer activar o TGF- $\beta$  apresentando-o a uma protease. As integrinas parecem ser outras moléculas importantes para regulação das vias de sinalização das TGF- $\beta$ , mas o seu estudo directo ultrapassa o âmbito desta investigação. (Goodwin and Jenkins 2009). Contudo, vale a pena realçar que integrinas podem activar a via das MAPKs de JNK, algo de interesse para o nosso estudo (Guo *et al.* 2004)

## 2. Endogлина

A endogлина (CD105) é uma glicoproteína transmembranar acessória do sistema do receptor TGF- $\beta$ , é composta por duas subunidades 95 kDa associadas por ligações dissulfureto, formando uma proteína madura homodimérica de 180 kDa. A endogлина é expressa em células endoteliais vasculares activadas, mas para além da sua expressão em células do endotélio, a endogлина é encontrada na superfície de outros tipos celulares (ver Tabela 3.)(Dallas *et al.* 2008).

A endogлина foi identificada nos anos 80 utilizando o anticorpo monoclonal 44G4, gerado ao imunizar ratos BALB com uma linha celular linfoblástica humana (Gougos and Letarte 1988). Em 1992 o seu cADN foi analisado e detectou-se que pertencia a uma proteína integral de membrana de tipo I (Gougos and Letarte 1990). Em 1993, foi-lhe atribuído o grupo de diferenciação CD105, uma vez que aumenta a sua expressão na transição de monócito a macrófago (Lastres *et al.* 1992; O'Connell *et al.* 1992). O gene humano da endogлина (*ENG*) foi localizado no loci 9q24, no cromossoma 9 (Fernandez-Ruiz *et al.* 1993).

A endogлина já foi encontrada em outros tipos celulares para além das células endoteliais, sendo expressa em células de origem hematopoética, como os precursores de células B, os proeritoblastos, os macrófagos e as células estromais da medula óssea (Buhning *et al.* 1991; Lastres *et al.* 1992; St-Jacques *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1996). Também se expressa em fibroblastos, células de músculo liso vascular, sincitotrofoblasts da placenta, condrócitos da cartilagem, células mesangiales do rim, células estreladas do fígado e em certos tipos de tumores, como melanoma e cancro da próstata (Gougos and Letarte 1988; Gougos *et al.* 1992; Altomonte *et al.* 1996; Robledo *et al.* 1996; Adam *et al.* 1998; Rodriguez-Barbero *et al.* 2001; Diez-Marques *et al.* 2002; Liu *et al.* 2002; Parker *et al.* 2003; Meurer *et al.* 2005).

Mutação do gene *ENG* da endogлина causa Telangiectasia Hemorrágica Hereditária de tipo I (HHT1) (McAllister *et al.* 1994). A endogлина possui vários efeitos biológicos, estando envolvida no processo de angiogénese e parece estar envolvida em certos tipos de cancros (Miller *et al.* 1999; Fonsatti *et al.* 2000; Jerkic *et al.* 2006b; Bernabeu *et al.* 2009) e em situações de pré-eclampsia (Jerkic *et al.* 2006b; Bernabeu *et al.* 2009).

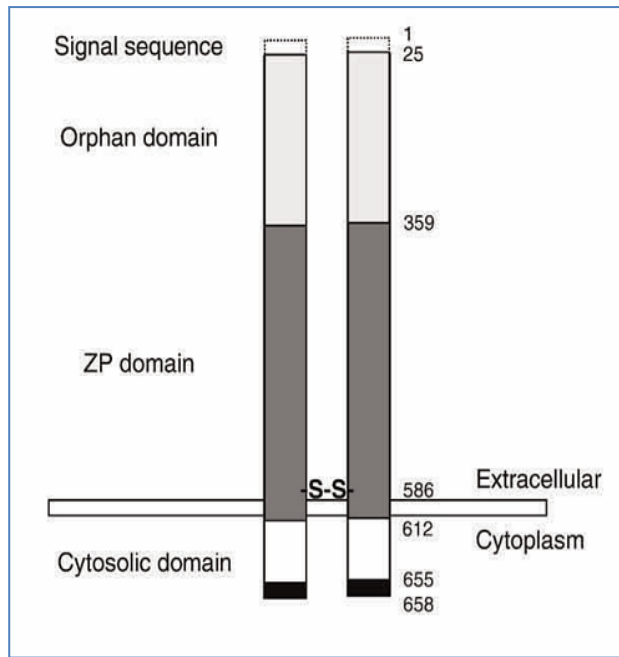
Uma vez que a descoberta da S-endogлина foi bastante recente, a maioria dos estudos sobre a endogлина efectuados referem-se à isoforma dominante, L-endogлина.

Tabela 3. Expressão de Endogлина (CD105) em tecidos humanos normais. Adaptado de (Dallas *et al.* 2008).

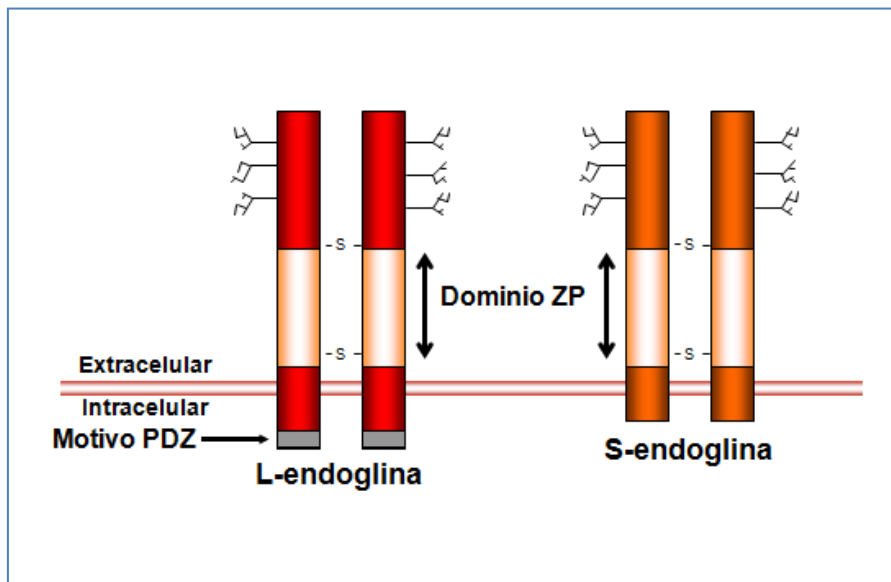
<b>Localização</b>	<b>Tipo Celular</b>
<b>Sistema Cardiovascular</b>	<b>Células Endoteliais</b>
	<b>Células do Músculo Liso Vascular</b>
<b>Sistema Hematopológico</b>	<b>Fibroblastos do Estroma da Medula Óssea</b>
	<b>Células B Progenitoras</b>
	<b>Precursos Eritróides</b>
	<b>Células CD34<sup>+</sup> Circundantes</b>
<b>Sistema Reticuloendotelial</b>	<b>Macrofagesina Intersticial do Baço</b>
	<b>Monócitos activados</b>
	<b>Macrografos Diferenciados</b>
	<b>Células Dendriticas Foliculares em órgãos linfóides</b>
<b>Sistema Genito-urinário</b>	<b>Células extraglomerulares intersticiais do Rim</b>
	<b>Células mesangiais glomerulares do Rim</b>
	<b>Células basais do túbulo seminefroso</b>
<b>Sistema embrionário</b>	<b>Melanócitos</b>
	<b>Sincitiotrofoblastos da Placenta</b>
	<b>Células mesenquimais do coração embriónico</b>

## 2.1 Estrutura da Endogлина

Como já foi anteriormente apontado, a endogлина é uma glicoproteína homodimérica da membrana celular com cerca de 180 kDa. A endogлина pode ser encontrada em duas isoformas, a L (*Large*) e a S (*Small*), cada uma divergindo da outra apenas na cauda citoplasmática. A L-endogлина possui uma cauda citoplasmática com 47 resíduos de aminoácidos enquanto a S-endogлина possui uma cauda de apenas 14 resíduos. Apesar das diferenças estruturais, ambas as formas podem ser fosforiladas (Fonsatti *et al.* 2003). A L-endogлина é a isoforma predominante.

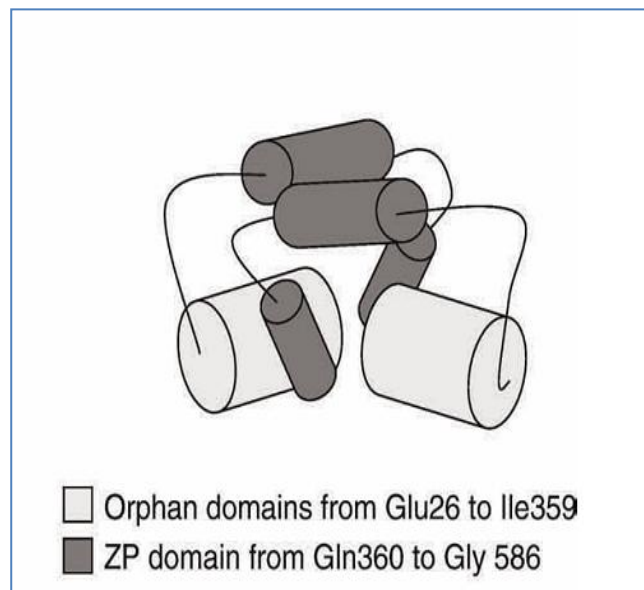


**Fig. 14. Representação esquemática da endoglina.** Endoglina é um receptor homodímero com um grande domínio extracelular de 586 resíduos de aminoácidos que contém um domínio órfão e um domínio ZP. A curta cadeia citosólica de 47 aminoácidos da isoforma L não possui motivos enzimáticos, mas contém vários resíduos de serina e treonina que podem ser fosforilados por várias cinases, incluindo mas não limitadas a T $\beta$ R11 e ALK1. Essa diferente capacidade para sofrer fosforilação parece ser a fonte de todas as diferenças funcionais entre as duas isoformas de endoglina. Adaptado de (Lebrin and Mummery 2008).



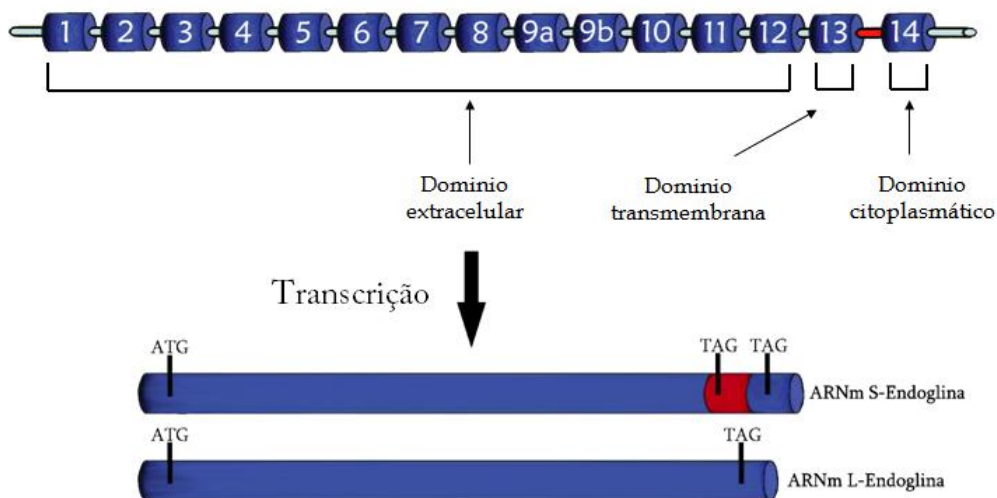
**Fig. 15. Comparação entre as isoformas de endoglina.** L-Endoglina (esquerda) e S-endoglina (direita) partilham o domínio extracelular, no entanto, variam a nível intracelular, a S-endoglina possuindo uma cauda menos curta, com menos motivos passíveis de fosforilação. Adaptado de (Bellon *et al.* 1993)

A estrutura terciária da endoglina foi recentemente determinada. A região extracelular de 561 aminoácidos está estruturada em forma de uma cúpula de monómeros anti-paralelos, rodeando uma cavidade que se manifesta num dos extremos. Cada subunidade é composta por três domínios bem definidos, dois deles correspondendo a motivos ZP, organizados sobre a forma de um monómero aberto em U. Estes domínios são possivelmente críticos para a expressão correcta de endoglina na superfície celular. Os domínios ZP servem como módulos para a polimerização de proteínas que dão origem a oligómeros de maiores dimensões. A sequência de aminoácidos do domínio extracelular da endoglina também possui vários locais de O- e N-glicosilação. O domínio citosólico de 47 não contém nenhuma actividade enzimática, mas é rico em serina e treonina, oferecendo vários locais de fosforilação. Na isoforma L da endoglina existe um domínio de união a motivos PDZ de tipo I de outras proteínas, um domínio que aparenta possuir um papel importante na regulação da fosforilação da endoglina por parte dos receptores tipo I e tipo II (Lastres *et al.* 1994; Guerrero-Esteo *et al.* 2002; Koleva *et al.* 2006).



**Fig. 16. Desenho descrevendo um rude esboço da organização estrutural de cada monómero de endoglina, baseado em reconstituição.** Adaptado de (Lebrin and Mummery 2008)

A isoforma curta, S-endogлина, surge devido a um mecanismo de “*splicing*” alternativo, e contém uma cauda citoplasmática de apenas 14 aminoácidos. Esta cauda mais curta possui menos locais de fosforilação que a isoforma longa. O processo de *splicing* ocorre devido à transcrição do intrão entre os exões 13 e 14 (Fig.17). Este *splicing* resulta num mRNA mais longo, contudo, como a sequência do intrão possui um codão de terminação, a tradução de uma proteína mais curta (Perez-Gomez *et al.* 2005; Lebrin and Mummery 2008).



**Fig. 17. Gene da endogлина e os ARNm das duas isoformas.** O gene da endogлина possui 14 exões. A diferença que resulta no encurtamento do braço citoplasmático da S-endogлина parece resultar de *splicing alternativo* entre exões 13 e 14.

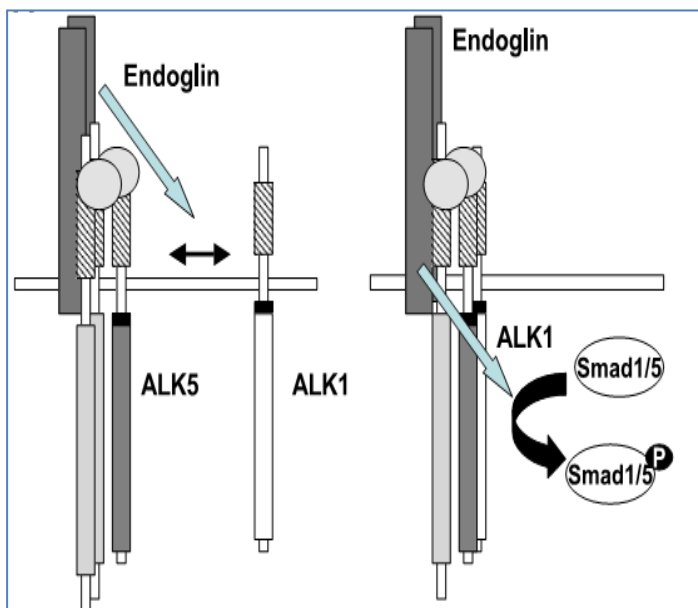
## 2.2 Endogлина e TGF- $\beta$

A endogлина é um receptor de Tipo III do TGF- $\beta$ , sendo importante para a regulação desta via de sinalização, mas não possui nenhum domínio catalítico, sendo considerado um receptor auxiliar de TGF- $\beta$  que une TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 com grande afinidade, mas apenas na presença de receptores Tipo I e tipo II. Não é capaz de ligar TGF- $\beta$ 2 (Cheifetz *et al.* 1992; Letamendia *et al.* 1998; Barbara *et al.* 1999; Blanco *et al.* 2005). Estudos *in vitro* comprovaram que também é capaz de ligar outros membros na da família TGF- $\beta$ , como activina A, BMP e BMP-7, sempre na presença dos seus respectivos

receptores, apesar de actualmente se verificar que a endogлина se pode ligar a BMP-9 independentemente de outros receptores, o que a poderia implicar em distintas vias de sinalização (Barbara *et al.* 1999; Scharpfenecker *et al.* 2007).

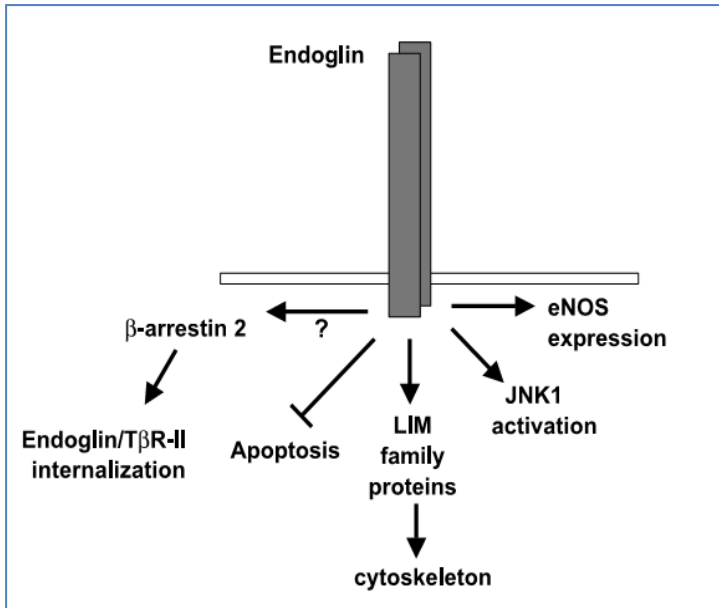
O mecanismo exacto de como a endogлина regula a sinalização por TGF- $\beta$  continua por determinar. Recentemente, com a descoberta das duas isoformas de endogлина, levantou-se a questão se as duas isoformas poderão influenciar de maneira diferente a resposta ao TGF- $\beta$ .

Apesar das grandes incógnitas que rodeiam a acção da endogлина, os receptores de TGF- $\beta$  ALK1 e ALK5 – receptor semelhante à activina 1 e 5 – parecem possuir uma relação íntima com o papel da endogлина sobre sinalização de TGF- $\beta$ . Resultados recentes mostram que os efeitos exercidos pelo TGF- $\beta$  resultam dum delicado equilíbrio entre as vias de sinalização que se iniciam ALK5 e ALK1. É relevante apontar que o papel do TGF- $\beta$  varia entre tipos celulares, com a concentração e o meio ambiente. As L- e S-endogлина podem ter efeitos diferentes na mediação de TGF- $\beta$  em diferentes tipos celulares (Duff *et al.* 2003; Lebrin *et al.* 2005; Velasco *et al.* 2008).



**Fig. 18. Modelos ilustrando o papel da endogлина no complexo receptor TGF- $\beta$ /cinase *activin-like* (ALK)1 na regulação de células endoteliais.** Estes modelos não são mutuamente exclusivos, mostrando duas maneiras pelas quais endogлина pode promover a sinalização por TGF- $\beta$ /ALK1. À esquerda: recrutando ALK1 para o complexo ALK5/T $\beta$ RII. À direita: estimulando actividade cinase de ALK1 ou o recrutamento de Smads para o complexo Adaptado de (Lebrin *et al.* 2005).

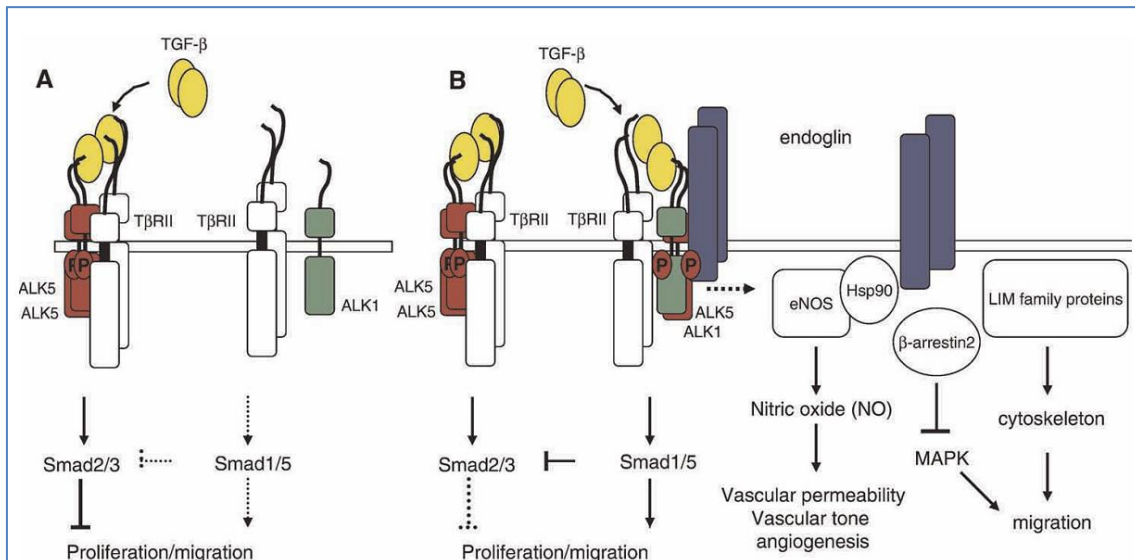
No entanto, o papel da endogлина na regulação da migração, proliferação e vias TGF- $\beta$ /ALK1 e TGF- $\beta$ /ALK5 é praticamente desconhecido e enublado por informação aparentemente contraditória. Apesar da parca quantidade de dados sobre as duas isoformas da endogлина, tudo parece sugerir um grande potencial como reguladoras da das TGF- $\beta$ . (Barbara *et al.* 1999; Arthur *et al.* 2000; Lebrin *et al.* 2005).



**Fig. 19. Possíveis papéis reguladores da endoglina independentes de TGF- $\beta$ :** A endoglina pode regular o comportamento de células endoteliais por: regulação da organização do citoesqueleto, protegendo células de apoptose induzida por hipoxia, estimulando a fosforilação de JNK1, regulando a expressão de sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e recrutando  $\beta$ -arrestina 2. Adaptado de (Lebrin *et al.* 2005).

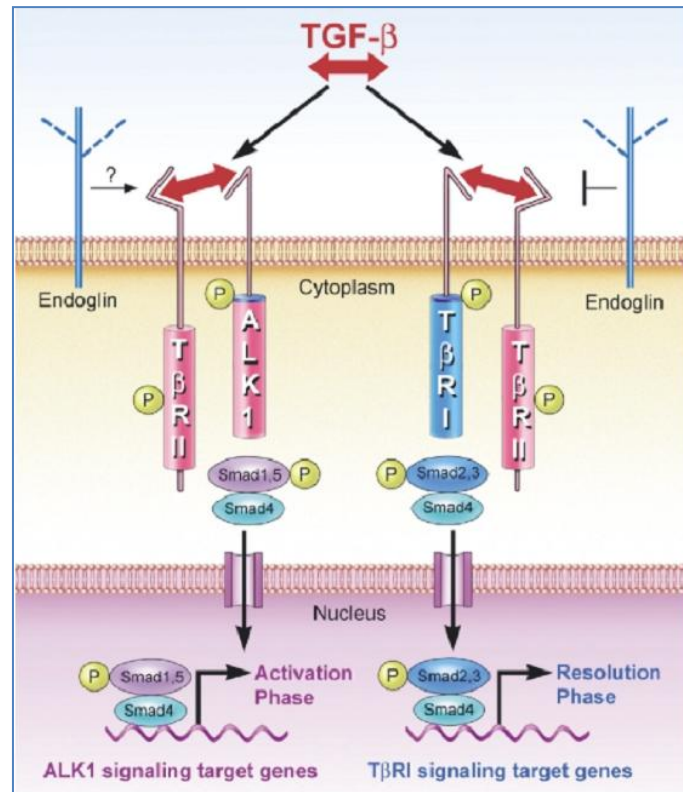
Na tentativa de explicar o papel da endoglina na sinalização por TGF- $\beta$  surgiram dois modelos, partindo de experimentos realizados com células endoteliais.

O modelo de Lamouille et al. (2002) sugere que o TGF- $\beta$  exerce as suas funções de indução/inibição da proliferação e da migração através de receptores de Tipo I em células endoteliais – os referidos ALK1 e ALK5. A activação de uma ou outra via leva a activação de diferentes Smad, resultando numa cascata de sinais que resultam em efeitos fisiológicos diferentes. Lamouille et al. defendem no seu modelo, que na ausência de endoglina, o TGF- $\beta$  se liga a ALK5, activando Smad 2/3 e aumentando a migração. Na presença da endoglina, o TGF- $\beta$  associa-se com o ALK1, activando a Smad 1/5, levando a uma diminuição da proliferação e migração celular (Lamouille et al. 2002). Este modelo desadequa-se de resultados mais recentes e do modelo actualmente tido em conta, que associa o ALK1 com a estimulação da proliferação e migração (Fig. 20) (Lebrin and Mummery 2008).



**Fig. 20. Regulação da angiogénese pela endoglina através da via de sinalização das TGF- $\beta$ .** TGF- $\beta$  estimula duas vias distintas por activação de receptores de Tipo I em células endoteliais, com efeitos opostos. A via TGF- $\beta$ /ALK5 por Smad 2/3 conduz à inibição da proliferação e migração celular, enquanto a via TGF- $\beta$ /ALK1 por Smad1/5 induz a proliferação e migração de células endoteliais. Endoglina é necessária para a sinalização por ALK1. Na ausência de endoglina, predomina a via TGF- $\beta$ /ALK5, mantendo o endotélio quiescente. (B) Expressão elevada de endoglina estimula sinalização por ALK1 e indirectamente inibe sinalização ALK5, promovendo a activação da angiogénese. Endoglina também controla o comportamento de células endoteliais independentemente de TGF- $\beta$  modulando a actividade de eNOS, a organização do citoesqueleto, e a via das MAPK. É de realçar que os efeitos proliferativos mediados por ALK1 podem depender do contexto, uma vez que existem dados que sugerem que pode ser anti-proliferativo. Adaptado de (Lamouille *et al.* 2002; Lebrin and Mummery 2008).

O segundo modelo, de Goumans *et al.* (2002), construído com base em experiências com baixas concentrações do TGF- $\beta$ , sugere um papel diferente para a endoglina. Segundo Goumans, tal como no modelo de Lamouille, o TGF- $\beta$  pode activar duas vias diferentes, a ALK1/Smad1/5 ou a ALK5/Smad2/3. No modelo de Goumans, a endoglina também parece favorecer a sinalização pelo ALK1. No entanto, os efeitos da activação do ALK1 são contraditórios ao modelo de Lamouille, pois a activação pelo TGF- $\beta$  do ALK1 e da Smad1/5 resulta num aumento da proliferação e migração. A activação do ALK5, favorecida pela ausência da endoglina, favorece a inibição da proliferação e migração (Goumans *et al.* 2002; Marchuk *et al.* 2003).



**Fig. 21. Modelo alternativo do papel de endoglina na troca angiogénica.** TGF- $\beta$  pode sinalizar duas vias distintas em células endoteliais. Sinais da ALK1 vão através de uma via que contém Smad1 ou Smad4, que pode conduzir a activação transcricional dos genes envolvidos na fase de resolução da angiogénese. Neste modelo, mutação de quer endoglina ou ALK1 poderá favorecer sinalização através de T $\beta$ RI, favorecendo a via da ALK5. Adaptado de (Goumans *et al.* 2002; Marchuk *et al.* 2003).

Estes dois modelos foram construídos a partir de informação obtida de ensaios com a isoforma L-endoglina. As diferenças estruturais podem sugerir diferentes papéis fisiológicos entre as duas isoformas de endoglina, a L e a S. Esta possibilidade revelou-se verdadeira na linha celular de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>. Nesta linha celular, a expressão da L-endoglina parece activar a via TGF- $\beta$ /ALK1. Enquanto S-endoglina parece activar também a via TGF- $\beta$ /ALK1, indicando uma maior estimulação da via TGF- $\beta$ /ALK5. Isto sugere, que em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, a L-endoglina estimula proliferação enquanto S-endoglina a diminui. Endoglina pode ser o mediador entre as vias TGF- $\beta$ /ALK1 e TGF- $\beta$ /ALK5, sendo o comportamento das células determinado pela proporção L-endoglina/S-endoglina. Este aparente equilíbrio é importante para o nosso estudo, uma vez que utilizamos a mesma linha celular (Velasco *et al.* 2008).

## 2.3 Papel biológico da endoglina

Apesar de não possuir capacidades catalíticas, a endoglina é um receptor acessório crucial para a regulação da sinalização por TGF- $\beta$ . Devido à importância desta via a nível biológica e o seu possível papel como regulador, a endoglina é uma das proteínas cujo estudo é mais importante para compreender todas as vias e processos controlados directa ou indirectamente por TGF- $\beta$ .

### 2.3.1 Telangiectasia Hemorrágica Hereditária

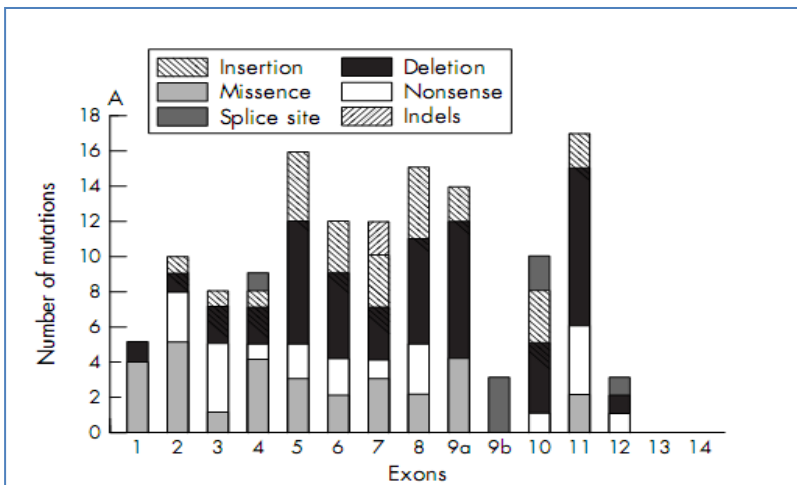
Mutação do gene ENG da endoglina causa Telangiectasia Hemorrágica Hereditária de tipo I (HHT1) (McAllister et al. 1994), sendo importante o seu estudo para perceber esta síndrome. Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (“*Hereditary haemorrhagic telangiectasia*”, HHT) ou síndrome de Rendu–Osler–Weber é uma desordem autossómica dominante que se caracteriza por epistaxe (hemorragia nasal), telangiectases (dilatações de vasos sanguíneos) e displasia vascular em vários órgãos. A prevalência da HHT é estimada em 1:10000 e mais elevada em algumas regiões geograficamente isoladas (Abdalla and Letarte 2006).

Indivíduos com HHT apresentam grande variabilidade de sintomas e manifestações clínicas, mesmo entre membros da mesma família. Epistaxe espontânea e recorrente parece ser a manifestação mais comum, ocorrendo em 90% dos pacientes com HHT. Telangiectases múltiplas na face, lábios, cavidade oral, nariz e dedos são comuns, mas também podem surgir no tracto gastrointestinal, particularmente no estômago e intestino delgado de pacientes idosos, que normalmente apresentam hemorragia gastrointestinal e deficiência de ferro na quinta ou sexta década de vida. Pode existir envolvimento do fígado em 40% dos pacientes, resultando normalmente em múltiplas telangiectases hepáticas. A HHT pode também conduzir a malformações arteriovenosas (Shovlin and Letarte 1999; Abdalla and Letarte 2006).

A HHT é, geneticamente, heterogénea. A síndrome surge devido a mutações em duas regiões, 9q33-q34.1 no cromossoma 9 (HHT tipo 1) e 12q11-q14 no cromossoma 12 (HHT tipo 2). A HHT tipo I é causada por uma mutação no gene ENG que codifica a endoglina. A HHT tipo 2 surge devido a mutações no gene ACVRL1 que codifica ALK1. Outros genes podem também estar envolvidos em HHT. O gene ENG parece apresentar

cerca de 155 mutações, todas presentes entre os exões 1 e 12 que codificam os domínios extracelulares. Parece haver menos mutações nos exões 1,9b e 12 que codificam os domínios transmembranares e nos exões 13 e 14, que codificam os domínios citoplasmáticos (Fig. 22) (McAllister *et al.* 1994; Cole *et al.* 2005; Abdalla and Letarte 2006).

Estas mutações parecem conduzir a proteínas mutantes instáveis, sem função e que na maioria das vezes falham a chegar à superfície da célula. Como tal, a HHT tipo 1 é causada por uma diminuição dos níveis de endogлина funcional causada por estas mutações responsáveis pela produção de uma proteína inactiva.



**Fig. 22.** Distribuição, frequência e tipos de mutações do gene ENG. Adaptado de (Abdalla and Letarte 2006)

### 2.3.2 Angiogénese

Apesar de todas as incógnitas que rodeiam a endoglinina, já foram estudados os seus efeitos na formação de vasos sanguíneos. A formação de vasos sanguíneos pode ser interpretada como dois processos: vasculogénese, que define a diferenciação primária *in situ* de precursores endoteliais da mesoderme; e a sua organização no plexo capilar primário e angiogénese, que define a formação de novos vasos por um processo de expansão a partir de vasos pré-existentes. As três isoformas de TGF- $\beta$ , a ALK 1, a ALK5, o  $\beta$ -glicano e a endoglinina foram implicadas como parte crucial do mecanismo de desenvolvimento vascular e da regulação da angiogénese e proliferação. (Lamouille *et al.* 2002; Lebrin *et al.* 2005).

A sinalização por TGF- $\beta$ 1 é importante para o desenvolvimento vascular, sendo a sua regulação um dos importantes papéis da endoglinina. Ambas as proteínas desempenham um papel crucial na vasculogénese e na angiogénese (Folkman and Klagsbrun 1987; Pepper *et al.* 1996).

A troca angiogénica, a passagem entre diferentes fases da angiogénese, parece ser regulada pela endoglinina. Existem dois modelos para a troca angiogénica, embora a informação disponível seja conflitua. O modelo de Lamouille *et al.* sugere que endoglinina regula a fase de regulação. Mais tarde, Goumans *et al.* (fig. 21) descobriu que a baixas concentrações do TGF- $\beta$ , a endoglinina actua na fase de activação, aumentando migração, enquanto o TGF- $\beta$  inibe migração e actua na fase de resolução. A endoglinina regula o TGF- $\beta$  e como tal, a fase de resolução da angiogénese. Contudo, a isoforma S da endoglinina pode regular a função do TGF- $\beta$  e como tal, mediar também a fase de activação do processo. Os modelos existentes, apesar de contraditórios, falham em incluir o papel das diferentes isoformas de endoglinina. Mais investigação sobre as diferenças entre a L e a S endoglinina poderá esclarecer as mecânicas de regulação da angiogénese e o aparentemente ambíguo papel da endoglinina. (Goumans *et al.* 2002; Lamouille *et al.* 2002; Marchuk *et al.* 2003; Perez-Gomez *et al.* 2005; Velasco *et al.* 2008).

### 2.3.3 Cancro

A via de sinalização do TGF- $\beta$  está envolvida nos processos de malignidade, proliferação e invasividade tumoral. Sendo a endogлина um regulador destas vias, é possível entender que o estudo deste receptor é muito importante no âmbito do cancro.

Apesar de ser primariamente expressa em células do endotélio vascular, é possível detectar um aumento da expressão de endogлина durante processos de embriogénese, processos inflamatórios, em situações de lesão arterial, em tecidos infectados, etc. Os mecanismos que levam a esta sobreexpressão de endogлина são provavelmente multifactoriais, mas condições de hipoxia parecem favorecer esta sobreexpressão. A angiogénese tumoral também é favorecida nas mesmas condições (Sanchez-Elsner *et al.* 2002; Bernabeu *et al.* 2009).

Uma elevada expressão de endogлина está co-relacionada com a proliferação de células endoteliais tumorais, parecendo ser um potente marcador da vascularização de tumores sólidos. Adicionalmente, em ratos haploinsuficientes para a endogлина, verificam-se respostas angiogénicas e angiogénese tumoral reduzidas (Miller *et al.* 1999; Fonsatti *et al.* 2000; Jerkic *et al.* 2006b; Bernabeu *et al.* 2009).

Estes dados sugerem que endogлина, em situações de sobreexpressão, é um importante promotor da angiogénese tumoral. Este facto torna-a um atraente alvo terapêutico de tratamentos antiangiogénicos, com o objectivo de impedir que os tumores formem novos vasos. Outra alternativa terapêutica envolve atingir vasos já formados, contudo, tal abordagem pode danificar outras células. Estudos *in vitro* com células endoteliais e *in vivo* com ratinhos submetidos a xeno-implantes tumorais favorecem uma abordagem antiangiogénica, uma vez que o bloqueio com anticorpos anti-endogлина diminui a proliferação tumoral e aumenta a sobrevivência dos ratinhos. Estes tratamentos apresentam também sinergia com outras formas de quimioterapia, assim, o bloqueio da endogлина afecta a regulação de vários processos celulares por interferência com sinais *downstream* (Bernabeu *et al.* 2009).

Apesar de todo o potencial terapêutico da endogлина, existem ainda importantes incógnitas. Todos os estudos elaborados baseiam-se em L-endogлина, a isoforma dominante. O papel da S-endogлина em tecido tumoral é praticamente desconhecido. O estudo desta isoforma pode elucidar mais sobre o papel da endogлина na angiogénese tumoral e permitir o aperfeiçoamento das terapêuticas já exploradas.

### 2.3.4 Pré-eclampsia

A pré-eclampsia é uma síndrome sistêmica que ocorre durante a gravidez. É clinicamente caracterizada pela existência de proteinúria e hipertensão, e é associada com morbidez e mortalidade tanto dos fetos como das mães. A patogênese da pré-eclampsia levantou muitas questões e ainda apresenta vários enigmas. A chave para entender esta patologia parecem ser os problemas no funcionamento da placenta, começando com invasão citotrofoblástica inadequada e terminando com disfunções endoteliais (Chaiworapongsa *et al.* ; Fang *et al.* ; Jacquemyn and Zemtsova ; Wang *et al.* 2009)

42

Vários factores envolvidos na angiogénese apresentam-se sobreexpressos em situações de pré-eclampsia, incluindo a endoglina. Estes factores são libertados pela placenta para a circulação maternal, causando as manifestações sistémicas da síndrome. Os mecanismos moleculares envolvidos neste processo são ainda desconhecidos, mas sugeriram-se vários candidatos que o regulam: a hipoxia, o eixo renina-angiotensina-aldosteron e o stress oxidativo, entre outros, parecem estar associados à formação de uma placenta anormal (Chaiworapongsa *et al.* ; Fang *et al.* ; Jacquemyn and Zemtsova ; Wang *et al.* 2009).

De momento, em parte devido às grandes incógnitas moleculares, não existe outra terapêutica para além da indução do parto. Um maior estudo da endoglina e do seu papel regulador constitui uma das linhas de investigação que pode fornecer mais informação sobre esta patologia.

*"We make our world significant by the courage of our questions and by the depth of our answers.*

**-Carl Sagan-**

43

# *Objetivos*



Os objectivos deste projecto são a definição do efeito da isoforma S da endogлина nos processos de migração celular e o estudo do seu mecanismo de acção. A consecução destes objectivos permitirá conhecer melhor a contribuição da isoforma S da endogлина nos processos celulares e moleculares em que está implicada. Para isso planeamos os seguintes objectivos:

1. Escolher um modelo celular para o estudo do efeito da expressão da isoforma S da endogлина.
2. Investigar os efeitos da S-endogлина sobre a migração celular.
3. Estudar o efeito da expressão de S-endogлина sobre a sinalização das MAPKs induzida por TGF- $\beta$ .
4. Investigar o efeito da expressão de S-endogлина sobre a rota de MAPK e o seu possível papel como mediador da migração celular.

*"Give anyone a lever long enough and they can change the world. It's unreliable levers that are the problem.*

**-Terry Pratchett-**

45

# *Materiais e Métodos*



## 1. Materiais

Todos os reagentes, anticorpos, materiais e aparelhos usados para a realização deste trabalho estão recolhidos nos apêndices que se encontram no final desta secção de Materiais e Métodos.

## 2. Métodos de cultura celular

### 2.1 Culturas celulares

Para a realização deste trabalho, utilizou-se a linha celular de mioblastos de músculo esquelético de ratinhos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>. As células foram mantidas num incubador a 37°C em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub>/ 95% ar. As manipulações que requereriam ambiente estéril foram realizadas numa câmara de fluxo laminar vertical.

Para manter estas células utilizou-se meio de cultura DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) com glucose (4,5g/l), antibióticos (50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina), 2,5 µg/ml de anfotericina B e o meio foi enriquecido com 10% de soro bovino fetal (FBS). O meio de cultura foi mudado a cada 48 horas e quando as células estavam confluentes realizaram-se passagens em diluição 1:10.

#### 2.1.1 Geração de clones estáveis de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>

Os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, transfectados de forma estável com as duas isoformas de endoglina (L- e S-endoglina) foram cedidos por Dr. Carmelo Bernabéu (CIB, CSIC, Madrid). Para esta tarefa foi utilizado um vector de expressão que continha a sequência completa do gene da L- ou S-endoglina humana. Os mioblastos foram co-transfectados com os vectores pcEXV-EndoL e pxV2neo em uma relação 10:1. A selecção dos clones estáveis realizou-se adicionando ao médio 400 µg/ml de antibiótico G418 (GIBCOBRL, Life Technologies), sendo catalogados como positivos ou negativos mediante um ensaio de citometria de fluxo. Para além da criação de clones estáveis de endoglina foi feita paralelamente uma transfecção só com o vector pxV2neo, gerando transfectantes *mock* que não contêm endoglina e foram usados como controlo das células transfectadas com endoglina. Os clones obtidos foram caracterizados mediante estudos bioquímicos e

funcionais, não se encontraram diferenças relevantes entre os mioblastos *mock* transfectados e a linha parental (Letamendia *et al.* 1998)

## **2.2 Técnicas básicas em culturas celulares**

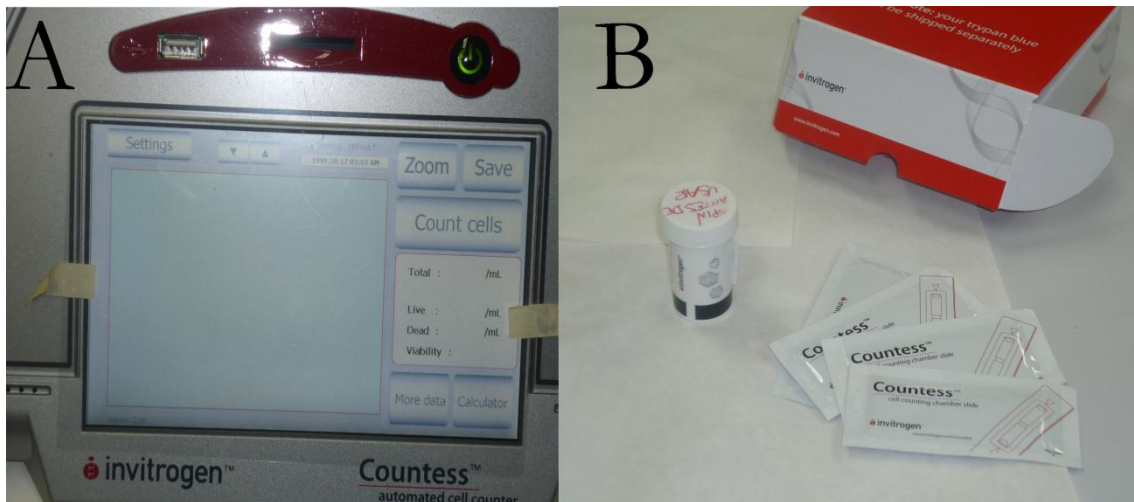
### **2.2.1 Tripsinização celular**

Os mioblastos são células aderentes, por isso, tanto para a manutenção da estirpe celular como para a realização das experiências, as células foram transferidas para o material de trabalho adequado (placas de petri, lâminas, etc).

Utilizou-se a técnica de tripsinização celular para descolar as células aderidas ao plástico e voltar a espalhá-las noutra suporte. Depois de retirar o meio e lavar com PBS, adicionou-se uma solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,05%, EDTA 0,02%) para romper as ligações que unem as células à superfície da placa. A acção da tripsina foi detida com a adição de meio de cultura e, em continuação, as células são transferidas a um tubo que é centrifugado a 300 g durante três minutos. O precipitado é ressuspendido em quantidade adequada de meio de cultura. Se a experiência o requeria, depois deste ponto procedeu-se à contagem celular.

### **2.2.2 Contagem celular**

As células destinadas à realização de experiências foram contadas depois da tripsinização através da utilização de um contador de celular *Countess (Invitrogen)*. Depois de ressuspender as células em meio de cultura, foram misturadas em proporção 1:1 com o corante de exclusão azul de tripano a 0,4%. Deste modo excluimos da contagem as células não viáveis, uma vez que apenas as células mortas ou danificadas incorporam o corante.



**Fig. 23. Sistema de Contagem Automática Countess (Invitrogen). (A)** Aparelho de Leitura e Contagem Automática de Células Countess **(B)** Azul de tripano (4%) e câmaras de contagem de Countess.

### 2.2.3 Congelação e descongelação das linhas celulares

Para a manutenção da linha celular congelaram-se as células em distintos passos. Para isso tripsinizaram-se as células e procedeu-se da forma explicada anteriormente. Finalmente eliminou-se o meio e as células ressuspenderam em 2ml de meio frio com 20% FBS e com 10% de DMSO.

A suspensão celular resultante conservou-se num frasco de crioconservação dentro de um recipiente em que a temperatura ia diminuindo lenta e gradualmente, seguindo um gradiente de 1°C por minuto quando se introduziu num congelador a 80°C. Depois de 24 horas, as células foram armazenadas num tanque de azoto líquido.

As células descongeladas foram depositadas imediatamente em meio de cultura DMEM com 10% FBS. De seguida foram centrifugadas, e as células foram ressuspensas e cultivadas numa placa de 100 mm. Posteriormente foram cultivadas durante 24 horas, após as quais se substituiu o meio de cultura, de modo a retirar eventuais restos de DMSO.

## 2.3 Tratamento de culturas

Para a eleição do tempo e da concentração para o tratamento com o agonista, as células foram tratadas com diferentes concentrações e tempos de tratamento de TGF- $\beta$ 1. Todos os tratamentos foram realizados me meio de cultura sem soro e com mioblastos Mock. Os tratamentos com o TGF- $\beta$ 1 foram realizados com concentrações alternadas durante o estudo da dose-resposta (1; 10; 12,5;25; 100 e 250 pM), tendo-se decidido usar a concentração 25 pM para outros tratamentos com TGF- $\beta$ 1.

Posteriormente foram realizados ensaios tempo resposta, onde as células foram tratadas com a concentração seleccionada de 25 pM durante diferentes períodos de tempo (5, 15 e 30 minutos). Seleccionou-se o tempo de exposição de 30 minutos.

Os ensaios da resposta das MAPKs à TGF- $\beta$ 1 foram realizados com mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina tratados durante 30 minutos com TGF- $\beta$ 1 25pM.

### **3. Análise do nível de expressão de proteínas**

#### **3.1 *Western Blot***

O método de *Western Blot* permite a identificação de proteínas de um extracto celular ou de tecido e baseia-se na separação de proteínas de uma amostra em função do tamanho e na sua posterior transferência para uma membrana. Nessa dita membrana são detectadas, mediante a utilização de anticorpos específicos contra as proteínas que se desejam identificar, denominados de anticorpos primários, e anticorpos secundários que reagem com os anticorpos primários. Os anticorpos secundários estão conjugados com peroxidase de rábano-de-cavalo (HRP de *horse radish peroxidase*) que ao reagir com o substrato que se adiciona posteriormente produz uma reacção facilmente detectável e proporcional à quantidade de proteína estudada.

##### **3.1.1 Obtenção de extractos de proteínas celulares**

Uma vez terminado o tratamento, as placas foram colocadas sobre gelo para reduzir o metabolismo celular. Foram lavadas com PBS frio para retirar o meio de cultura e possíveis restos celulares e lisaram-se com tampão de lise frio (Tris base 20 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol %, IGEPAL CA-630 1%), ao qual se adicionou inibidores de proteases (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche*) e fosfatases (*PhosSTOP Phospatase Inhibitor Cocktail Tablets - Roche*). O lisado celular centrifugou-se a 10000 g a 4°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação, recolheu-se o sobrenadante (extracto de proteínas) e guardou-se as amostras a -20°C até serem utilizadas.

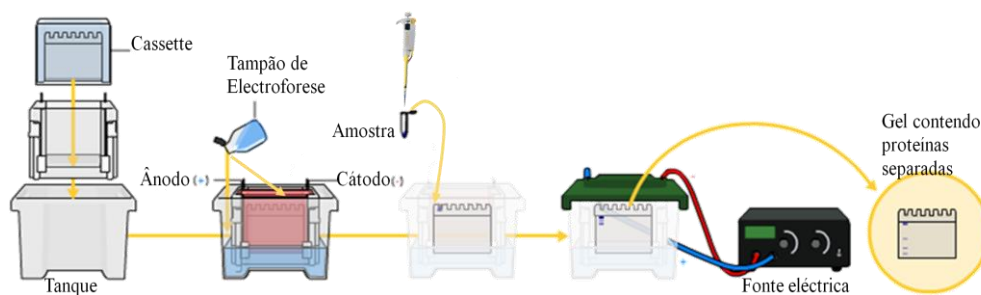
### 3.1.2 Determinação da concentração proteica

Para a quantificação das proteínas nos extractos proteicos seguiu-se o protocolo do *Kit* comercial colorimétrico *DC Protein Assay* (Bio-Rad), baseado no método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Mediu-se a absorvância a 720 nm em um leitor de placas de ELISA e os resultados foram analisados com o programa *KC-Junior* (BIO-TEK Instrument).

### 3.1.3 Preparação das amostras e electroforese

As proteínas são separadas através de uma electroforese vertical em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico-gel de poliacrilamida para electroforese, de *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) com distintas percentagens de acrilamida dependendo da proteína que se deseja analisar. As amostras são tratadas em condições desnaturantes, adicionando tampão de carga (Tris base 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0,0005% pH 6,8) e fervendo a 100°C durante 5 minutos segundo Laemmli (Laemmli 1970). O gel correu posteriormente em tampão de electroforese (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 1,7 mM em cubetas Mini-PROTEAN®III) aplicando uma voltagem constante de 130 Volts (V).

Em situações em que não são necessárias condições desnaturantes, os lisados celulares foram misturados com o tampão de carga sem  $\beta$ -mercaptoetanol e sem ebulição. A cada amostra recolhida realizou-se um controlo de endoglina. Nestas situações, para visualizar os diferentes pesos moleculares da S e L endoglina, os lisados celulares não precisaram de ser desnaturados e como tal, foram estudados nestas condições.



**Fig. 24. Processo de Electroforese.** Descrevendo a montagem do gel na cassete e a sua disposição no tanque, seguido pela deposição de tampão de electroforese no tanque, deposição da amostra nos poços do gel e montagem final do sistema.

### 3.1.4 Transferência

As proteínas separadas e incluídas em gel de acrilamida transferiram-se para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) mediante transferência semi-seca, usando o sistema TransBlot®SD (Bio-Rad) a 25°C durante 30 minutos e a temperatura ambiente, no seu tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris base 25 m M, pH 8,3).

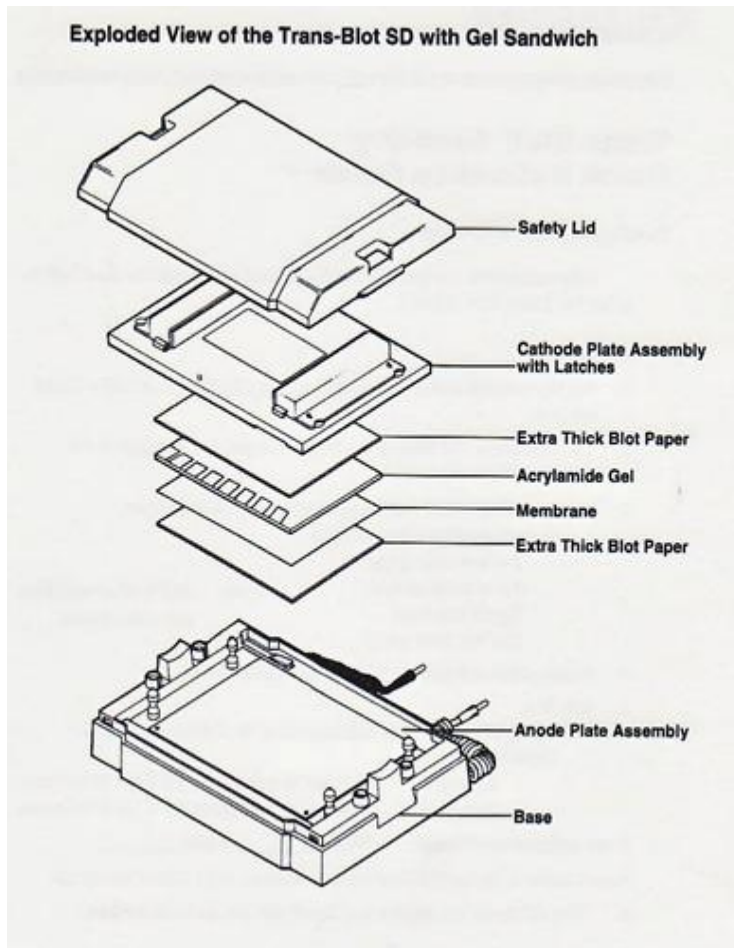


Fig. 25. Esquema demonstrando a montagem do “sandwich” usado na transferência semi-seca por Trans-Blot SD (Bio-Rad). Extra Thick Blot Paper (Bio-Rad) é embebido em tampão de transferência. De seguida, deposita-se a membrana e o gel, de modo delicado e sem deslocar as camadas inferiores ou formar bolhas. Termina-se a sandwich com outro Extra Thick Blot Paper embebido em tampão de transferência. Deposita-se a placa contendo os cátodos e inicia-se a transferência.

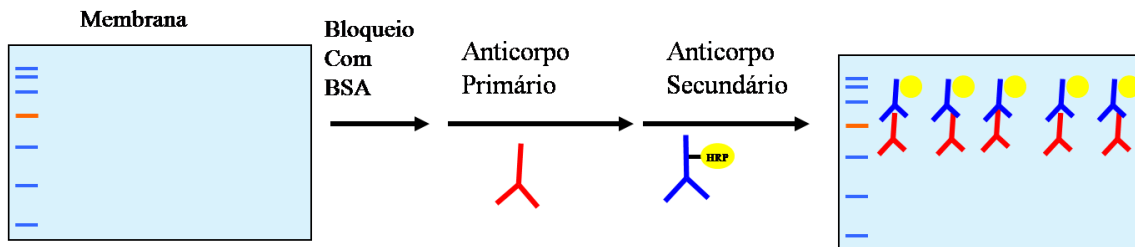


Fig. 26. Cadeia de Tratamento da Membrana. Após transferência e obtenção da membrana com as proteínas, procede-se ao bloqueio com albumina bovina, seguida de incubação com anticorpo primário. Finalmente, a membrana é incubada com um anticorpo secundário que se liga ao anticorpo primário. Este anticorpo secundário é responsável pela detecção da proteína.

### 3.1.5 Bloqueio e incubação com anticorpos

Previamente à incubação com anticorpos, procedeu-se ao bloqueio da superfície de membrada não ocupada por proteínas. Para isso, uma vez finalizada a transferência, lavou-se a membrana com tampão de lavagem (Tween-20 0.1%, NaCl 150 mM, Tris 20mM pH 7.5) e incubou-se com tampão de bloqueio (BSA em tampão de lavado, a concentração de BSA dependendo da proteína estudada) durante 1 hora a temperatura ambiente (ou toda a noite a 4°C) e em agitação. Posteriormente, incubou-se a membrana com o anticorpo primário (Tabela 3), durante pelo menos noventa minutos (as referências e casas comerciais dos anticorpos estão no *Apêndice 2*). Depois da incubação com o anticorpo primário fazem-se 3 lavados de 7 minutos com tampão de lavado e se incuba a membrana com o correspondente anticorpo secundário, uma imunoglobulina (IgG) conjugada com HRP durante trinta minutos.

**Tabela 4. Massa molecular (MM) de cada proteína e se detalham as diluições dos anticorpos correspondentes.**

Proteína	MM	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
p-ERK 1/2	44/42 kDa	Mouse anti-pERK 1/2 1:1000 (Santa Cruz)	Anti-Mouse IgG 1:15000 (Santa Cruz)
ERK 1	44/42 kDa	Rabbit Anti-ERK1 1:1000(Santa Cruz)	Anti-Rabbit IgG 1:15000 (Invitrogen)
p-JNK 1/2	46 kDa	Rabbit Anti-pJNK1/2 1:1000 (Cell Signaling)	Anti-Rabbit IgG 1:15000 (Invitrogen)
JNK 1	46 kDa	Rabbit anti-JNK1 1:1000 (Santa Cruz)	Anti-Rabbit IgG 1:15000 (Invitrogen)
p-p38	38 kDa	Rabbit anti-p-p38 1:1000 (Cell Signaling)	Anti-Rabbit IgG 1:15000 (Invitrogen)
p38	38 kDa	Rabbit anti p-38 1:1000 (Cell Signaling)	Anti-Mouse IgG 1:15000 (Santa Cruz)
Endogлина	160/180 kDa	Mouse Anti-Endoglin 1:5000	Anti-Mouse IgG 1:15000 (Santa Cruz)
Tubulina	60kDa	Mouse Anti-Tubulin 1:5000 (Calbiochem)	Anti-Mouse IgG 1:15000 (Santa Cruz)

### 3.1.6 Revelação

Para a detecção das bandas utilizou-se um sistema baseado na oxidação do luminol por HRP e potenciado por fosfo-iodofenol. As membranas incubaram-se durante um minuto com os reagentes correspondentes (Tris-Cl 0,1M pH 9,35 com 42,5% fosfo-iodofenol e 39% luminol). Imediatamente e em escuridão, pressionou-se a membrana sobre uma película e se introduziu na máquina de revelar. Por último, a película foi digitalizada e quantificou-se a densidade óptica das bandas obtidas com o programa *Scion Image* (*Scion Corporation*).

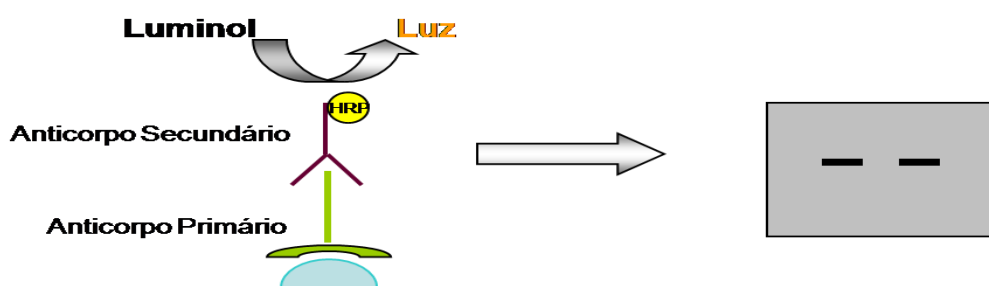


Fig. 27. Detecção da proteína. Esquema representativo da detecção do complexo proteína-anticorpo primário-anticorpo secundário, detectável através da reacção entre HRP e luminol.



Fig. 28. Máquina de revelação Medical X Ray Processor (*Kodak*).

### 3.1.7 Reutilização de membranas

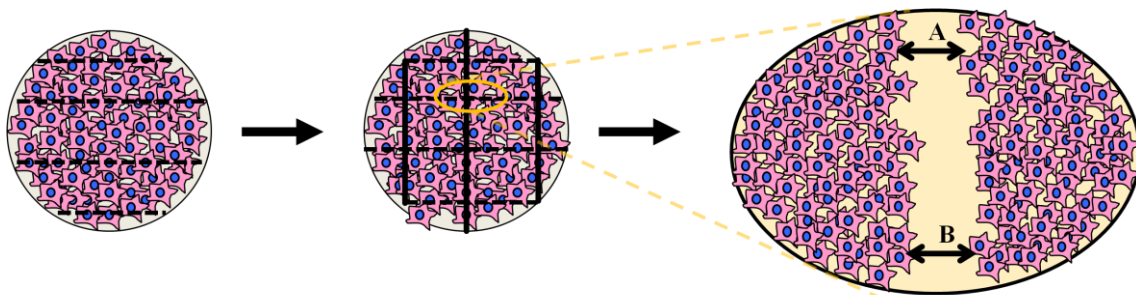
Algumas das membranas de *Western blot* reutilizaram-se para a análise de outras proteínas. Antes de reincubar uma membrana com outros anticorpos, submeteu-se a um lavado, durante 15 minutos (primeira reutilização, ou 20 minutos (segunda reutilização), com um *kit* comercial (*Re-Blot Plus Strong Solution*)) e dois lavados de 10 minutos à temperatura ambiente com tampão de lavado. De seguida incubou-se com solução de bloqueio, continuando com o protocolo normal de *Western Blot*.

## 4. Estudo da migração celular

### 4.1 Microscópio de Célula Viva

No estudo da migração, realizaram-se ensaios de *wound healing*. Estes ensaios decorreram durante um período de 24 horas, usando placas de petri de 60 mm, com 4 ml de meio de cultura DMEM com 10% de soro. Não foram utilizados inibidores da divisão celular ou meio de cultura privado de soro, uma vez que estes não iriam criar condições uniformes, adicionando mais variáveis: os inibidores da divisão celular actuam a nível tubular, afectando a capacidade de migração; enquanto as células estudadas, L e S endoglina, estão retratadas na literatura como possuindo diferentes capacidades de adesão e proliferação na ausência ou na presença de soro (Obreo *et al.* 2004; Velasco *et al.* 2008).

Às placas de 60 mm realizou-se uma “ferida” transversal, uma linha recta realizada com a assistência de uma ponta capilar (fig. 29).



**Fig. 29. Técnica de *Wound Healing*.** São realizados cortes transversais na placa de petri com uma pipeta capilar. É selecionado um local da ferida, onde a migração das células é estudada. O encuntamento das distâncias entre frentes celulares (A e B) permite calcular a cinética da migração.

As placas são colocadas no microscópio de célula viva Axiovert 200M (Carl Zeiss) durante 24 horas, sendo possível observar a progressão da migração. As células são mantidas a condições adequadas à sua manutenção (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Nos períodos de 6, 12 e 24 horas, as células são fotografadas e a sua cinética migratória determinada.



**Fig. 30. Microscópio de célula viva Axiovert 200M.** E sistemas acoplados que permitem manutenção de condições de crescimento e manutenção celular (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) assim como representação, análise e computação de dados.

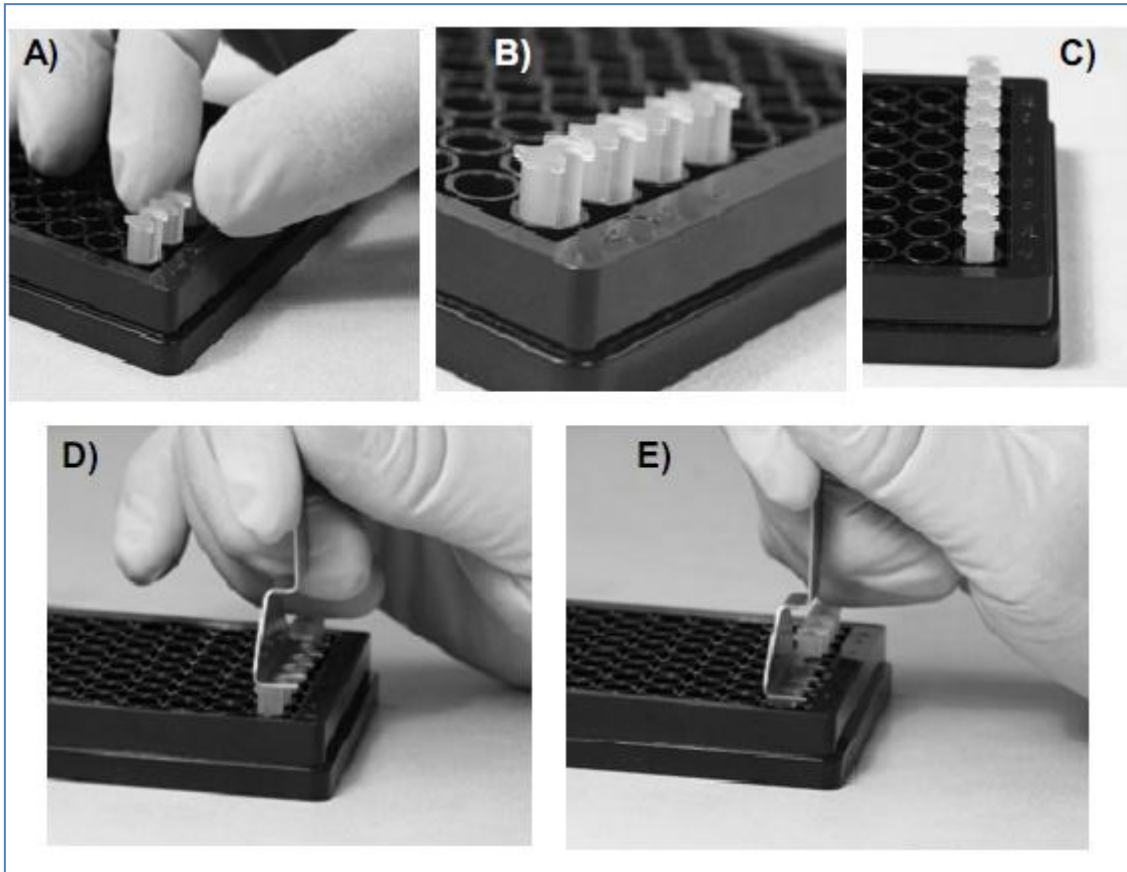
## 4.2 Ensaios de Reparação

Para ser mais precisos na determinação da migração celular, decidimos tentar um novo sistema. A comparação entre os processos de migração entre diferentes tipos celulares foi realizada através de um kit de migração celular *Oris™* (Platypus Technologies). Este kit permite estudar as capacidades de migração e invasão celular. O princípio da técnica consiste na criação de uma zona de detecção no centro de cada poço numa placa de 96 poços, através do uso de *stoppers*. Esta técnica pode ser adaptada para diversos ensaios, sendo uma ferramenta versátil, que preserva a morfologia celular e permite monitorizar a tempo real a migração e/ou invasão celular sem obstrução de membranas.



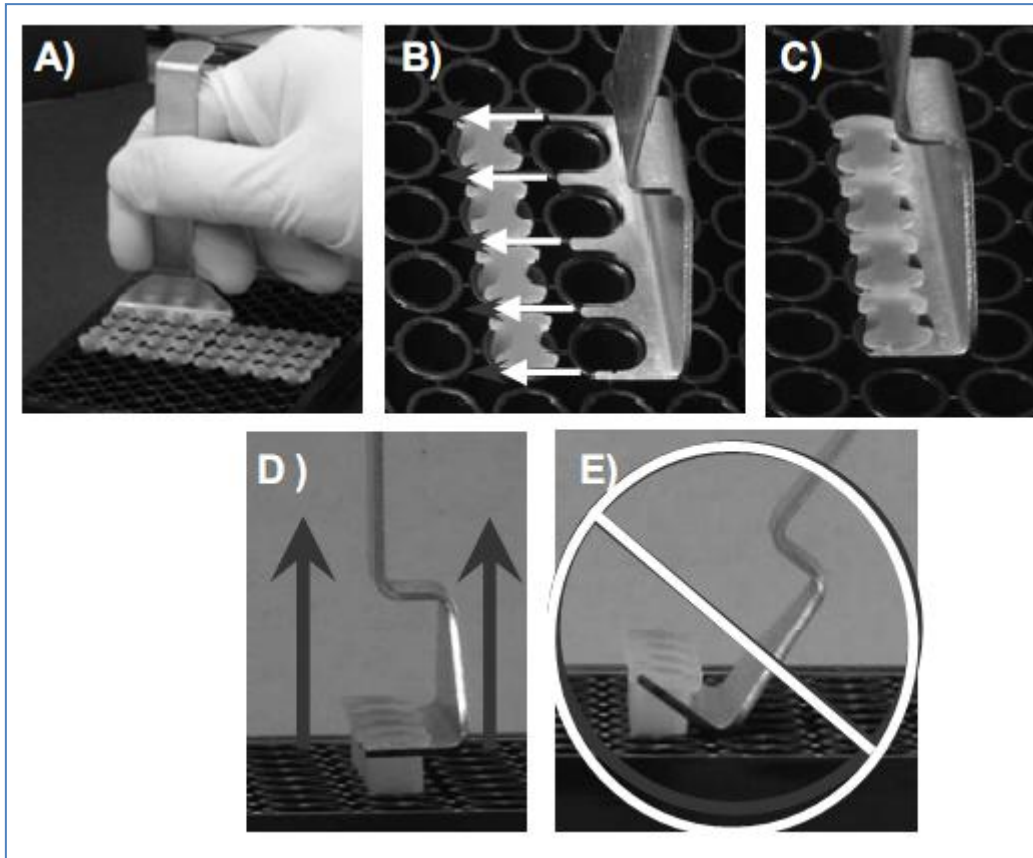
**Fig. 31. Princípio da técnica de Análise de Reparação por recurso a Stoppers**

Esta técnica é extremamente recente, requerendo uma descrição precisa da sua utilização. Em placas de 96 poços negras, são colocados os *stoppers* nos poços (Fig. 32 A, B e C) e pressionados com o pente incluído no kit (Fig. 32 D e E).



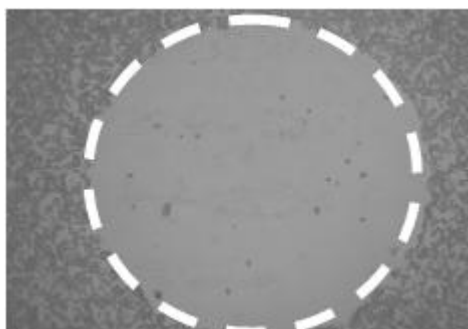
**Fig. 32. Processo de inserção dos *stoppers* nos poços. (A)** Colocação dos *stoppers* nos poços, **(B)** *Stoppers* parcialmente inseridos, **(C)** Inserção correcta de *stoppers*, **(D)** Pressionar os *stoppers* nos poços, **(E)** *Stoppers* completamente inseridos.

Após inserção dos *stoppers*, cultivam-se as células na área em redor. Quando as células estão cultivadas, removem-se os *stoppers* com auxílio do pente, encaixando-o nos *stoppers* e levantando-os verticalmente de um só movimento (Fig. 33).



**Fig. 33. Processo de remoção dos *stoppers* nos poços. (A, B e C).** Posicionamento dos pentes nos *stoppers* antes da remoção, **(D)** Levantar *stoppers* verticalmente, **(E)** NÃO inclinar *stoppers*.

Este processo cria um círculo com 2 mm de diâmetro que permite, através de detecção por fluorescência, realizar estudos de migração (Fig. 35). À placa aplica-se uma máscara fornecida com o kit, que permite que seja detectada apenas a fluorescência na zona de detecção (Fig. 34).



**Fig. 34. Área de determinação de reparação.** Com o auxílio de uma máscara, é detectada a fluorescência no círculo central, permitindo determinação a migração celular.

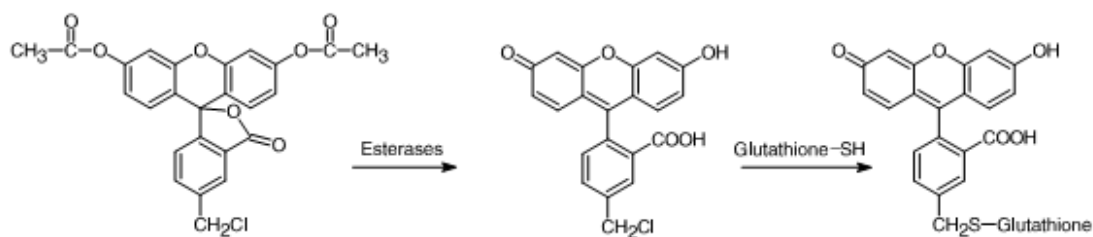
#### 4.2.1 Provas de viabilidade e eleição de concentração celular

Antes de estudar a migração, foram elaboradas provas para decidir os tempos de adesão e a quantidade de células necessárias para tornar confluentes os poços. Para isso, foram preparados ensaios em triplicado com os três tipos celulares: Mock, L e S endoglina. Foram cultivados poços contendo três diferentes concentrações de células: 500 000 células/ml, 250 000 células/ml e 125 000 células/ml.

A partir dos dados recolhidos destas provas, optou-se por estudar a migração com uma concentração de 500 000 células/ml, deixando-as aderir à placa durante 12 horas antes de retirar os *stoppers*.

#### 4.2.2 Provas de coloração

A fluorescência foi usada para a detecção da reparação de tecidos, uma vez que esta pareceu-nos a técnica mais precisa para determinar as diferenças do processo de reparação nos mioblastos. Novamente foram cultivados poços contendo três diferentes concentrações de células: 500 000 células/ml, 250 000 células/ml e 125 000 células/ml. As células foram coradas em uma solução de 2,5 mM de *CellTracker Orange CMRA (Invitrogen)* durante 30 minutos e observadas ao *Microscópio de Fluorescência Axiovert 200M (Carl Zeiss)*. As células foram observadas à excitação de 538 nm e 604 nm de emissão.



**Fig. 35. Reações intracelulares do corante CellTracker™.** As duas reações intracelulares que ocorrem após inclusão da células. A reação com glutathiona S-transferase ocorre primeiro, assegurando a impermeabilidade, mas a reação com esterases é mostrada primeiro, uma vez que a corante é não fluorescente antes de ser transformado pelas esterases celulares.

Este corante é adicionado directamente no meio de cultivo, passando livremente através das membranas. Contudo, uma vez no interior das células, o corante é transformado em produtos de reacção impermeáveis. O corante possui um grupo clorometilo que reage com tióis, sendo intracelularmente transformado por glutathiona S-transferase. Após inserção celular, esterases clivam o corante, obtendo um produto que emite fluorescência (Fig. 35).

Após selecção da quantidade células, realizaram-se provas com as concentrações de 2,5; 5; 10; 15 e 25 mM de *CellTracker Orange*, para aferir qual a concentração mais adequada, sem que se verifiquem alterações morfológicas das células. Seleccionou-se a concentração de 10 mM, aplicada durante 45 minutos, seguida de um lavado com médio de cultura e PBS.

### 4.2.3 Reparação da Superfície Celular

Tendo-se optado por 50 000 células por poço e uma concentração de 10 mM de *CellTracker Orange (Intritrogen)*, realizaram-se as experiências. As células foram contadas e plaqueadas, aderindo à placa durante 12-16 horas. Após este período de tempo, foram coradas. A experiência foi realizada em quadruplicado, com mioblastos Mock, L e S endoglina. Foram realizados três tratamentos para cada tipo celular, e realizada uma única vez às zero horas. Um tratamento com TGF- $\beta$  25 mM, outro com inibidor U0126 25  $\mu$ M durante 30 minutos de tratamento e um contendo tanto TGF- $\beta$  como U0126. As células

foram incubadas em condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e a sua fluorescência medida às 24, 48 e 72 horas no leitor de fluorescência *Fluoroskan Ascent FL* (*Thermo Scientific*), usando a máscara do kit para assegurar detecção apenas na zona desejada. As células foram mantidas com médio com soro para evitar desagregação celular dos mioblastos L e S endoglina.

## Apêndice 1: Listagem de reagentes e produtos

Reagente/Produto	Casa Comercial
Agarose	Cambrex Bio Science
Acrilamida	Bio-Rad Laboratories
Anfotericina B	Sigma Aldrich
Antibiótico G418	Life Technologies
APS (persulfato de amônia)	Sigma Aldrich
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma Aldrich
BSA (albumina sérica bovina)	Sigma Aldrich
CellTracker Orange CMRA	Molecular Probes, Invitrogen
CellTracker Red	Molecular Probes, Invitrogen
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Sigma Aldrich
dNTPs	Applied Biosystems
ECL (Relação de Western Blot)	Amersham Biosciences
EDTA	Sigma Aldrich
Etanol	Probus
Glicerol	Merck
Glicina	Sigma Aldrich
Glutamina	Merck
HCl	Sigma Aldrich
Hoeschst 33258	Molecular Probes, Invitrogen
Igepal CA-630	Sigma Aldrich
jetPEI <sup>TM</sup>	Polyplus-transfection
Kit colorimétrico de determinação de proteínas	Bio-Rad Laboratories
Kit de purificação de ADN Maxipreps	Promega
Kit de reciclagem de Western Blot RE-Blot Plus	Chemicon, Millipore
Lifofectamina	Life Technologies
Marcador de ADN 100pb	Invitrogen
Marcador de pesos moleculares para proteínas	Fermentas Life Sciences
Meio de cultura DMEM	Gibco, Invitrogen
Metanol	Merck
NaCl	Sigma Aldrich
NH <sub>4</sub> Cl	Panreac Química S.A.U.
Ortovanadato sódico (Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
Penicilina-Estreptomicina	Biowittaker <sup>TM</sup> , Lonza
PFA (paraformaldéido)	Sigma Aldrich
PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Primers	Isogen Life Science
Prolibreno	Sigma Aldrich
SDS (Dodecil sulfato de sódio)	Sigma Aldrich
Taq polimerase (TaqFastStart)	Roche

Transcriptase reversa (M-MLV RT)	Promega
TEMED (Tetra-metil-etilenodiamina)	Sigma Aldrich
TGF- $\beta$ 1	R&D Systems
Tripsina-EDTA	Gibco, Invitrogen
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypan blue	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich
U0126 (Inibidor MEKs/ERKs)	Promega

## Apêndice 2: Listagem de anticorpos utilizados

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Espécie</b>	<b>Casa Comercial/Procedência</b>
Anti-ERK 1 K23 (sc-94)	Coelho	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-JNK 1 C-17 (sc-474)	Coelho	Cell Signaling
Anti-p38 A-12 (sc-7972)	Ratinho	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-p-ERK E-4 (sc-7383)	Ratinho	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-p-JNK (9251S)	Coelho	Cell Signaling
Anti-p-p38 (9211S)	Coelho	Cell Signaling
Anti-Tubulina DM1A (CP06)	Ratinho	Calbiochem
Anti-endogлина humana	Ratinho	mAb P3D1 (hibridoma de ratinho)

<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Espécie</b>	<b>Casa Comercial/Procedência</b>
Anti-coelho HRP (sc-2004)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-ratinho Alexa Fluor®488 (A-11001)	Cabra	Molecular Probes, Invitrogen
Anti-ratinho Cy <sup>TM</sup> 3 (PA43002)	Cabra	Amersham Life Science
Anti-ratinho HRP (sc-2005)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.

### Apêndice 3: Listagem de material e equipamento utilizado

Material/Equipamento	Casa Comercial
Câmara de fluxo laminar vertical Gelaire TC-48	Cultek
Cassete de revelação	Amersham Biosciences
Centrifuga 5702	Eppendorf AG
Centrifuga 5417R	Eppendorf AG
Citômetro FACS Calibur	BD Biosciences
Crioviales de congelação	Menzel-Gläser
Equipamento de transferência de semi-seco TransBlot®SD	Bio-Rad Laboratories
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad Laboratories
Equipamento de Western blot Mini Protean®III	Bio-Rad Laboratories
Fonte de alimentação para electroforese e transferência Power Pac 3000 e PowerPacBasic	Bio-Rad Laboratories
Incubador Celular Forma Scientific 3111	Thermo Scientific
Leitor de placas de ELISA EL 800	BIO-TEK Instrument
Leitor Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific
Máquina de revelação Medical X Ray Processor	Kodak
Membrana de PVDF	Pall Corporation
Microscópio de Célula Viva e Fluorescência Axiovert 200M	Carl Zeiss
Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Fujifilm
Pipetas de plástico de 5, 10 e 25 mL	BD Falcon™
Placas de cultura	BD Falcon™
Porta-objectos	Menzel-Gläser
Raspadores de células	BD Falcon™
Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad Laboratories
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad Laboratories
Tubos de plástico de 1,5 e 2 mL	Eppendorf AG
Tubos de plástico de 15 e 50 mL	BD Falcon™
Universal Cell Migration Assembly Kit (Oris)	Platypus Technologies

*"The truth may be puzzling. It may take some work to grapple with. It may be counterintuitive. It may contradict deeply held prejudices. It may not be consonant with what we desperately want to be true. But our preferences do not determine what's true."*

**-Carl Sagan-**

## *Resultados e Discussão*

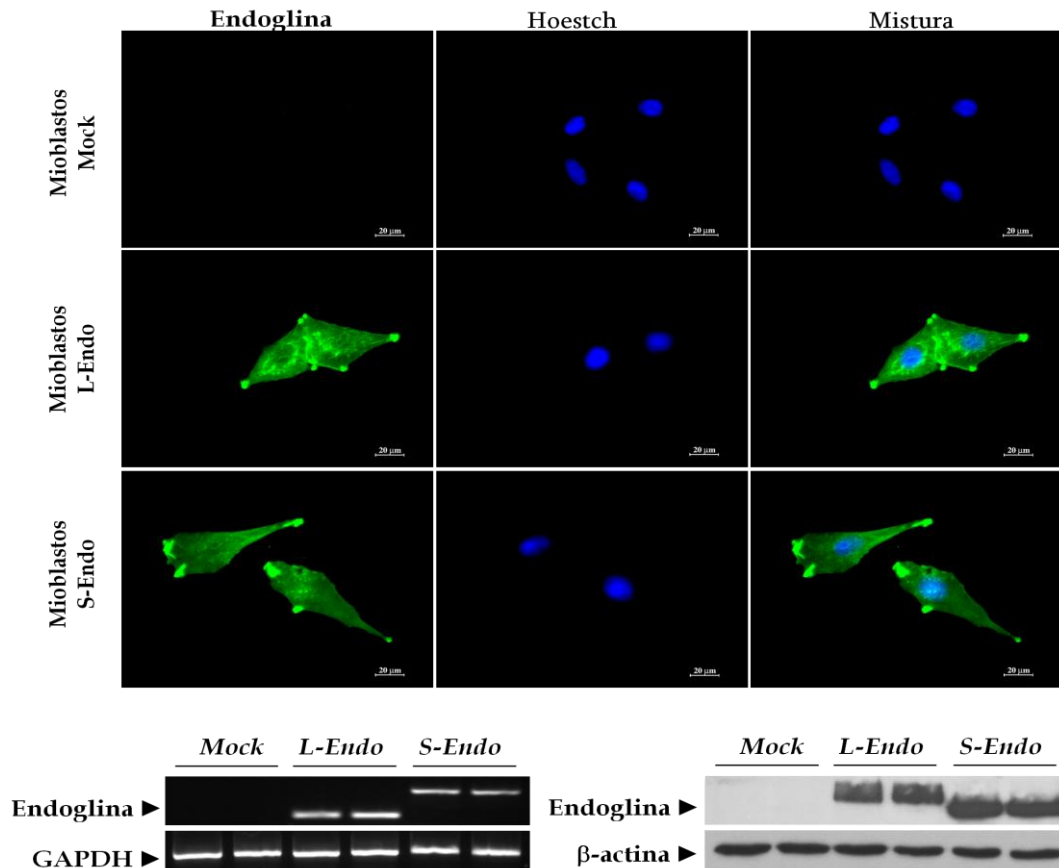


## 1. Escolher um modelo celular para o estudo do efeito da expressão da isoforma S da endogлина.

Como foi anteriormente apontado, a endogлина é uma proteína crucial na regulação da sinalização do TGF- $\beta$  e encontra-se em duas isoformas, a L e a S. Aparentemente, a proporção entre as isoformas L e S é um dos factores determinantes na mediação das vias de sinalização de TGF- $\beta$ , definindo a resposta fisiológica ao sinal (Velasco *et al.* 2008). Apesar de vários estudos aportarem alguma luz sobre os efeitos das duas isoformas na principal via de sinalização do TGF- $\beta$ , os efeitos das diferentes isoformas da endogлина sobre a comunicação cruzada entre vias são praticamente desconhecidos. É relevante apontar que apesar de se saber que em condições fisiológicas a isoforma S da endogлина se expressa de forma minoritária, pouco ou nada se sabe sobre o comportamento da S-endogлина em condições patológicas ou sobre o efeito da expressão diferencial de L e S endogлина sobre a mesma célula.

Com a tecnologia vigente, é impossível distinguir entre proteínas L e S-endogлина, o que requer a construção de modelos adequados ao estudo das duas isoformas da endogлина. As culturas de linhas celulares miogénicas de rata são amplamente utilizadas como modelo de estudo de efeitos da via de sinalização do TGF- $\beta$ , como por exemplo, proliferação e diferenciação. Uma destas linhas celulares é a linha L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, que apresenta a característica importante de não expressar endogлина (Nadal-Ginard 1978). Assim, utilizando mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> transfectados com as isoformas L e S de endogлина, podemos contar com um modelo de estudo do papel da isoforma S de endogлина em comparação com os efeitos da expressão da L-endogлина, sempre na presença de um controlo negativo para qualquer uma das isoformas.

Na análise de imunofluorescência foi possível observar os núcleos das células, assim como as células marcadas com anticorpos anti-endogлина que reconhecem um epitopo da parte extracelular da endogлина, igual em L- e S-endogлина, o que demonstra que cada célula expressa endogлина. Existe ausência de expressão de endogлина nos mioblastos Mock (Fig. 36). Por PCR e Western Blot foi possível verificar que cada cultura apresenta a forma de endogлина correspondente pois a isoforma L-endogлина, mais pesada, migra menos no *Western Blot*. As células Mock não demonstraram nenhuma das duas isoformas de endogлина (Fig. 36).



**Fig. 36.** Expressão de L e S endoglina nos mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, Imunofluorescência (cima), PCR (inferior esquerdo) e Western Blot (inferior direito) da Endoglina nos mioblastos Mock, L-endo e S-endoglina.

## 2. Determinação de condições de trabalho

A literatura actual sugere que a sinalização pelo TGF- $\beta$  e os efeitos fisiológicos despoletados podem ser amplamente influenciados pelo tipo celular em questão, as concentrações de TGF- $\beta$  e o tempo de exposição. Como tal, ao estudar um processo dependente desta via é essencial construir modelos que permitem seleccionar uma concentração e um tempo de trabalho, usando concentrações e tempos que permitem uma observação sensível e em quantidades relativamente baixas que não causem sobreexpressão, modificação do sinal ou situações de *cross-signaling* e *feedbacks* interferentes.

Os ensaios realizados permitiram aferir as condições de tratamento mínimas adequadas para a obtenção de comunicação cruzada e transmissão de sinal através via de sinalização de TGF- $\beta$  Não Smad. As vias de sinalização dos TGF- $\beta$  e das MAPK possuem vários pontos em comum, comunicando e regulando-se mutuamente a vários níveis, seja

por activação dos receptores pela endogлина, pela fosforilação de Smads ou por outras vias desconhecidas independentes de Smads (Derynck and Zhang 2003).

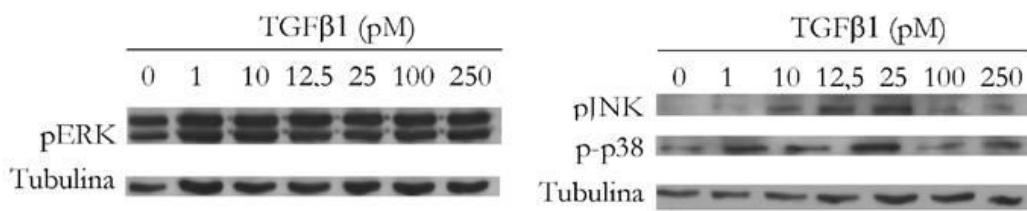
As células em estudo foram contadas, semeadas em placas e mantidas em crescimento durante 2-3 dias, até obterem 80% de confluência, período após qual se procedeu à deprivação de soro seguida pelos tratamentos.

## 2.1 Selecção da concentração de TGF- $\beta$

A concentração é um factor crucial quando se estuda as respostas a uma molécula sinalizadora. É um facto bem documentado que bastam pequenas quantidades de uma molécula sinalizadora para despoletar amplas cascatas de sinalização com grande variedade de efeitos, cascatas estas que podem ser reguladas por mecanismos de *feedback* negativo ou positivo. É conhecido que o TGF- $\beta$  sabe-se que possui efeitos diferentes, por vezes até antagónicos, dependendo da sua concentração. (Moustakas *et al.* 2002; Pardali and Moustakas 2007).

Conhecendo estes dados, elaboramos um experimento para determinar a concentração mínima de TGF- $\beta$  que permite uma activação clara dos componentes da via das MAPK, sem possíveis interferências de mecanismos cruzados de *feedback* ou de regulação negativa. Na literatura disponível, a maioria dos trabalhos baseados na activação de TGF- $\beta$  usaram concentrações entre 100 e 500 pM. O facto de termos de trabalhar não com uma mas com duas vias de sinalização, estudando os efeitos do TGF- $\beta$  sobre as proteínas da via das MAPKs ERK, JNK e p38, pode inserir interferências e variáveis desconhecidos De modo a eliminar esses possíveis interferentes, decidimos trabalhar com as concentrações mínimas possíveis.

Para a determinação da concentração de trabalho do TGF- $\beta$  procedeu-se à elaboração de um ensaio dose-resposta. Assim, as células Mock da linha L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> foram tratadas durante 30 minutos com diferentes concentrações de TGF- $\beta$  (1; 10; 12,5; 25; 100 e 250 pM). Utilizando *Western blot*, quantificamos e comparamos as expressões de pERK, de p-p38 e de p-JNK em células submetidas a diferentes concentrações de TGF- $\beta$  (Fig. 37).



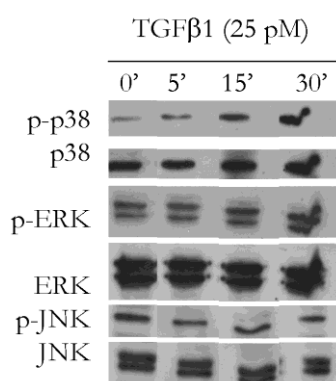
**Fig. 37. Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de TGFβ1 sobre pERK, pJNK e p-p38 em mioblastos mock L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>.** Os mioblastos foram mantidos em ausência de soro durante 24 horas. Foram tratados durante 30 minutos com doses distintas de TGFβ1 e foram posteriormente lisados. A activação das moléculas foi analisada por *Western Blot*. Utilizou-se tubulina como controlo de carga.

A análise por *Western Blot* permitiu-nos estudar a expressão e fosforilação induzida por TGF-β sobre a ERK, a JNK e a p38. Existe uma clara indução da fosforilação da ERK mesmo a baixas concentrações, algo que se mantém relativamente constante. Contudo, tanto a p-JNK como a p-38 sofrem um gradual aumento às concentrações de 1 e 25 pM, sofrendo uma ligeira diminuição à 100 e 250 pM, provavelmente devido à activação dalgum sistema de *feedback* negativo que actua “*upstream*” das duas vias. Esta regulação negativa das vias JNK/p38 MAPK foi já demonstrada, uma vez a fosforilação de ambas proteínas são activadas pela TAK1 e pela TRAF6 “*upstream*”, a sua actividade sendo induzida pelo TGF-β (Shim *et al.* 2005; Jadrich *et al.* 2006; Zhang 2009).

Conscientes da existência deste possível mecanismo de regulação negativa sobre a via das JNK/p38 MAPK, elegemos a concentração de trabalho de 25 pM de TGF-β, de modo a assegurar detecção destas proteínas.

## 2.2 Selecção do tempo de tratamento

Tendo já escolhido uma concentração de trabalho, procedeu-se à determinação do tempo ideal de exposição. Usando novamente mioblastos Mock da linha L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, estas células foram tratadas todas com a mesma concentração do TGF- $\beta$  (25 pM). Os tempos de exposição foram 0, 5, 15 e 30 minutos. As células foram lisadas e as proteínas detectadas por *Western Blot* (Fig. 38).



**Fig. 38. Efeito de diferentes tempos de exposição de TGF $\beta$ 1 sobre pERK, ERK, pJNK, JNK, p38 e p-p38 em mioblastos mock L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>.** Os mioblastos foram mantidos em ausência de soro durante 24 horas. Foram tratados durante 0, 5, 15 e 30 minutos com 25 pM de TGF $\beta$ 1 e foram posteriormente lisados. A expressão e activação das moléculas foram analisadas por *Western Blot*.

Muitos dos sinais cruzados e das vias de sinalização TGF- $\beta$  Não Smad não dependem de factores de transcrição e/ou da modificação da expressão genica. As duas vias interagem constantemente com os receptores e ligandos de ambas as vias. Isto implica que modificações da via das MAPK induzidas pela TGF- $\beta$  ocorrem numa janela de tempo apertada, entre 5 a 15 minutos. Assim sendo, para reduzir a interferência devido a aumento da transcrição e activação indirecta por vias de sinalização que interactuam com TGF- $\beta$ , quantificaram-se as três proteínas, ERK, p38 e JNK, assim como as suas formas fosforiladas durante um intervalo de 0 a 30 minutos.

As análises por *Western Blot* evidenciam um aumento das proteínas fosforiladas após o tratamento com TGF- $\beta$ . Qualquer destes tempos poderia ser usado nos experimentos posteriores, contudo a determinação da fosfo-p38 é apenas clara ao fim de trinta minutos. Devido à difícil detecção desta proteína, elegeu-se o tempo de 30 minutos como o ideal para todas as experiências.

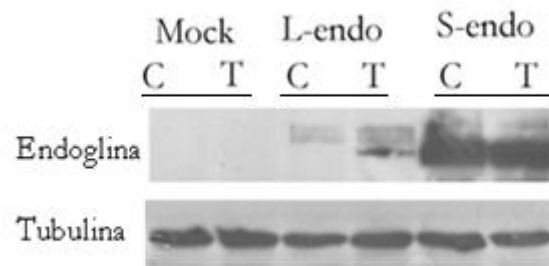
### 3. Estudo das diferenças na expressão e fosforilação de MAPKs em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, que expressão, ou não, L- e S-endogлина

Após determinação da concentração de TGF- $\beta$ 1 e do tempo de tratamento, 25pM e 30 minutos respectivamente, procedeu-se à análise da expressão e fosforilação de ERK, JNK e p38 em células de mioblastos da linha L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, usando três modelos: um carecendo de endogлина (Mock), outros dois com capacidade de expressar a isoforma L ou a isoforma S de endogлина.

Como foi anteriormente referido, as duas isoformas da endogлина variam na sua sinalização citoplasmática e asseguram que a sinalização por TGF- $\beta$  tenha resultados diferentes, possivelmente explicando papéis bifuncionais e aparentemente contraditórios da sinalização das TGF- $\beta$ , como é o caso da indução e inibição da proliferação. (Barbara *et al.* 1999; Arthur *et al.* 2000; Lebrin *et al.* 2005). A L-endogлина activa a via TGF- $\beta$ /ALK1, que induz maior proliferação e menos expressão de matriz extracelular. A S-endogлина activa a via TGF- $\beta$ /ALK5, que leva a uma diminuição da proliferação e aumento da produção de matriz extracelular (Barbara *et al.* 1999; Arthur *et al.* 2000; Lebrin *et al.* 2005; Velasco *et al.* 2008).

Este possível papel da endogлина na via canónica dos TGF- $\beta$  levanta importantes questões. Devido à promiscuidade entre as vias de sinalização dos TGF- $\beta$  e das MAPKs, é importante aferir se a endogлина possui algum papel activo na activação da ERK, da JNK e da p38 pelo TGF- $\beta$  e como varia este comportamento quando é mediado pela isoforma L ou S de endogлина.

Em todas as amostras utilizadas, realizaram-se controlos. Um controlo, feito com tubulina, assegurava a carga correcta e a presença da mesma quantidade de proteína em todas as amostras. Adicionalmente, por cada amostra recolhida realizou-se uma membrana sem tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, para poder comparar e observar que as amostras continham a forma adequada de endogлина (Fig. 39).



**Fig. 39. Comparação da endoglina entre diferentes amostras.** Sem desnaturação foi possível comparar as duas proteínas e verificar que as amostras possuíam as isoformas adequadas de endoglina.

### 3.1 Expressão e fosforilação de ERK em Mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>

As interações entre a via de sinalização das TGF- $\beta$  e a via das ERK iniciam-se na membrana citoplasmática. As ERK são activadas por MEKs, por sua vez activadas por Raf anteriormente fosforilado por Ras. Ras é libertado para o citoplasma como resultado de uma cadeia de fosforilações que ocorre a partir dos RTKs integrados na membrana (Zhang 2009).

Grande parte da indução da fosforilação de ERK parece ocorrer nas RTKs, e os receptores de Tipo I do TGF- $\beta$  interagem com as RTKs para despoletar a via das MEK/ERKs que resulta na fosforilação das ERKs. Os receptores de Tipo II também parecem interagir com a via de sinalização das MEKs/ERKs (Schlessinger 2000; Lee *et al.* 2007; Zhang 2009).

Apesar de se conhecer como as duas vias interagem a nível da membrana citoplasmática a partir dos receptores de Tipo I e Tipo II, o papel da endoglina sobre a activação da ERK induzida por TGF- $\beta$  é praticamente desconhecido. O nosso grupo demonstrou que a activação da ERK induzida por TGF- $\beta$  em mioblastos que expressam L-endoglina é menor do que nas células Mock (Rodriguez-Barbero *et al.* 2006). No entanto, não se sabe nada sobre o efeito da exposição de S-endoglina.

Mediante estudo da expressão e fosforilação de ERK, os efeitos da endoglina sobre a fosforilação da ERK manifestam-se imediatamente. As duas isoformas parecem ter efeitos opostos, em relação aos mioblastos Mock. A L-endoglina reduz a fosforilação de ERK, enquanto a S-endoglina aumenta-a. Estas diferenças observam-se mesmo na ausência

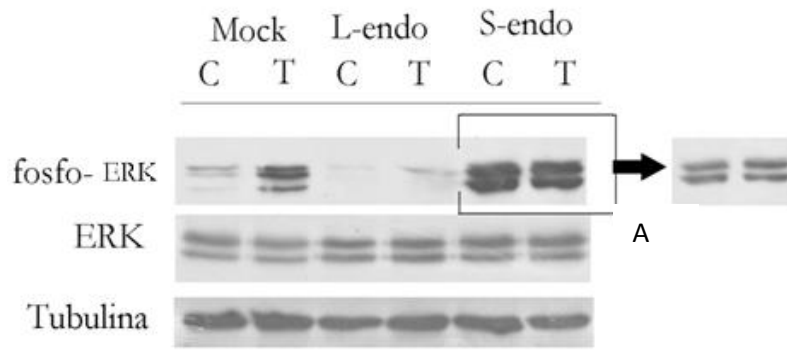
de TGF- $\beta$ : este facto sugere que a endogлина possui interacções com a via das ERKs independente de activação por TGF- $\beta$  (Fig. 40 e 41).

Quando sujeitas a tratamento por TGF- $\beta$  (25 mM) durante 30 minutos, observa-se um aumento da fosforilação de ERK nas três estirpes celulares. Não se observam grandes diferenças na fosforilação de ERK induzida por TGF- $\beta$  entre células que expressam as isoformas L e S de endogлина, o que sugere que apesar das diferenças em termos de efeito basal, ambas formas possuem o mesmo efeito na regulação da activação da ERK induzida por TGF- $\beta$  (Fig. 41).

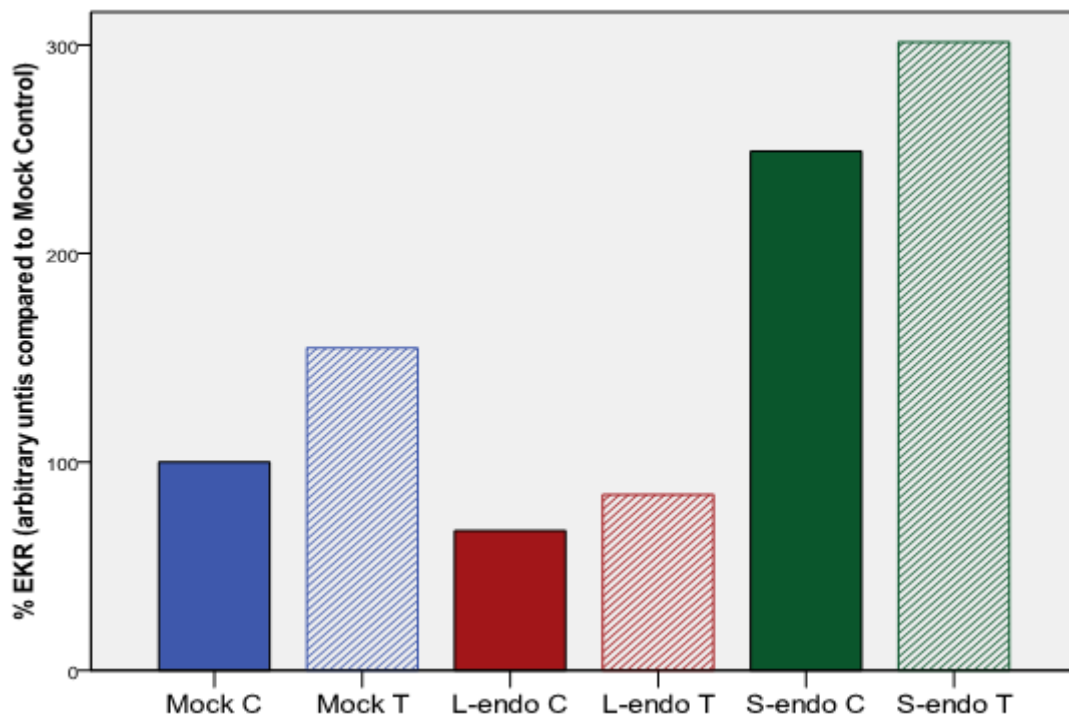
Existe uma grande diferença entre a activação de ERK nas células que expressam as isoformas L- e S-endogлина. Esta, é muito superior nas células que expressam S-endogлина e muito mais baixa nas células que expressam L-endogлина que nos mioblastos Mock. Devido às limitações da técnica de *Western Blot*, para obtermos algo comparável e válido temos de realizar todos os experimentos na mesma membrana e com recurso às mesmas condições de revelação. Após repetidos testes, a exposição mínima que permite a detecção de fosforilação nos mioblastos L-endogлина ultrapassa o ponto de saturação da S-endogлина. Na Fig. 42, a diferença entre a activação em mioblastos L-endogлина e S-endogлина, devido aos limites de detecção do método, parece menor do que na realidade. O aumento real da activação da ERK nos mioblastos que expressam S-endogлина é muito superior ao apresentado graficamente. Convém realçar que o *Western Blot* é uma técnica qualitativa, embora possa ser considerada semi-quantitativa por alguns autores. Embora esta técnica permita detectar as proteínas, quantificá-las de forma precisa ultrapassa os limites de sensibilidade da técnica.

Não foram observadas diferenças na expressão de ERK nos mioblastos Mock, L- e S-endogлина tratados ou não com TGF- $\beta$  (Fig. 40 e 42).

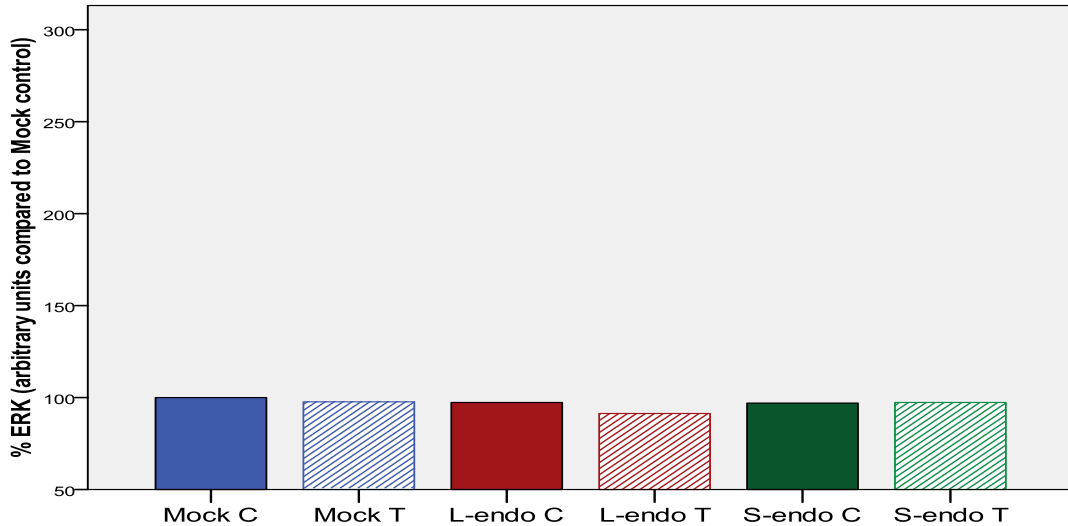
Foi utilizada a tubulina como controlo de carga, demonstrando que todos os poços foram carregados com a mesma quantidade de proteínas (Fig. 40 e 43).



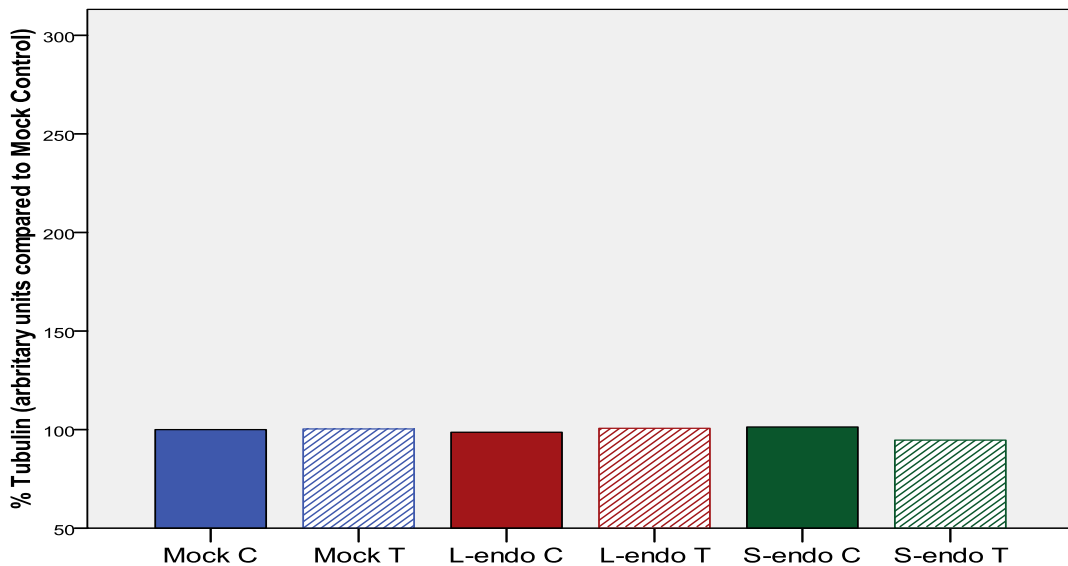
**Fig. 40. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão e fosforilação de ERK em mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina.** Os mioblastos foram deprivados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A detecção das proteínas ERK e pERK foram feitas por Western Blot. Devido à forte detecção de fosfo-ERK das células S-endoglina, revelou-se com menos tempo de exposição (A) de modo a observar qualquer diferença entre a activação basal e induzida por tratamento com TGF- $\beta$ . C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 41. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a fosforilação de ERK.** Os mioblastos foram deprivados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de pERK foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de fosfo-ERK. Os resultados estão expressos em percentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 42. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão ERK.** Os mioblastos foram privados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de ERK foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de ERK. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 43. Controlo de carga de ERK e fosfo-ERK com tubulina.** A determinação de tubulina foi feita por Western Blot e recurso a anticorpo anti-tubulina de rato. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de tubulina. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .

## 3.2 Expressão e fosforilação de JNK

A fosforilação da JNK é induzida pelo TGF- $\beta$  por uma via de sinalização não canónica e independente de Smads. A JNK é activada pela MKK4, que é por sua vez activada “*upstream*” por MAP3Ks. Entre as várias MAP3Ks capazes de fosforilar a MKK4, encontra-se a TAK1, uma cinase activada pelo TGF- $\beta$ . Como tal, TAK1 é provavelmente o alvo predilecto para a activação da JNK através do TGF- $\beta$ . A activação da TAK1 resulta da interacção entre o TGF- $\beta$  e a proteína TRAF6, que é um ponto em comum para a activação induzida com TGF- $\beta$  das vias da JNK e da p38 (Zhang 2009).

Estudando por *Western Blot* a expressão e fosforilação de JNK nas três estirpes de mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina a nível basal e após tratamento com TGF- $\beta$  (25 pM durante 30 minutos), é possível observar que este tipo de isoforma de endoglina influencia a fosforilação da JNK (Fig. 44 e 45). Existe menor fosforilação da JNK na presença de L-endoglina e maior na presença de S-endoglina.

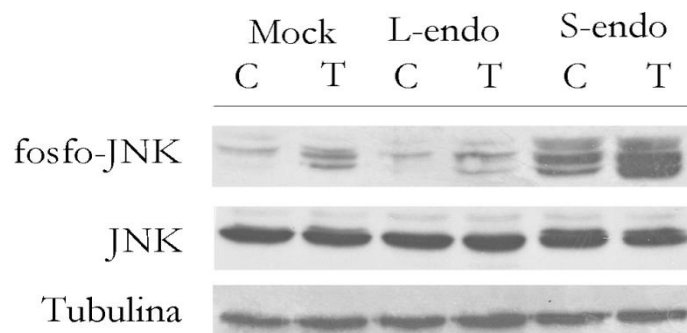
Os estudos prévios sobre o efeito activador da endoglina sobre a fosforilação de JNK, não fizeram a distinção entre as duas isoformas de endoglina. Estes estudos demonstraram que a presença de endoglina leva a um aumento da fosforilação de JNK. (Guo *et al.* 2004). O nosso grupo também realizou estudos sobre a activação de JNK na presença de L-endoglina, mas devido às limitações do anticorpo, não nos foi possível observar a JNK fosforilada. Estes estudos levaram-nos a escolher um novo anticorpo mais potente, de modo a poder estudar a fosforilação de JNK (Obreo *et al.* 2004; Rodriguez-Barbero *et al.* 2006).

A endoglina parece activar JNK1 independentemente da via de sinalização do TGF- $\beta$  pela endoglina. Este facto pode explicar diferenças no efeito de activação de MAPKs que partilhem com a JNK activadores *upstream* – como é o caso da p38. (Lebrin, Deckers *et al.* 2005). Este aspecto deve ser tido em conta em qualquer estudo destas duas MAPKs.

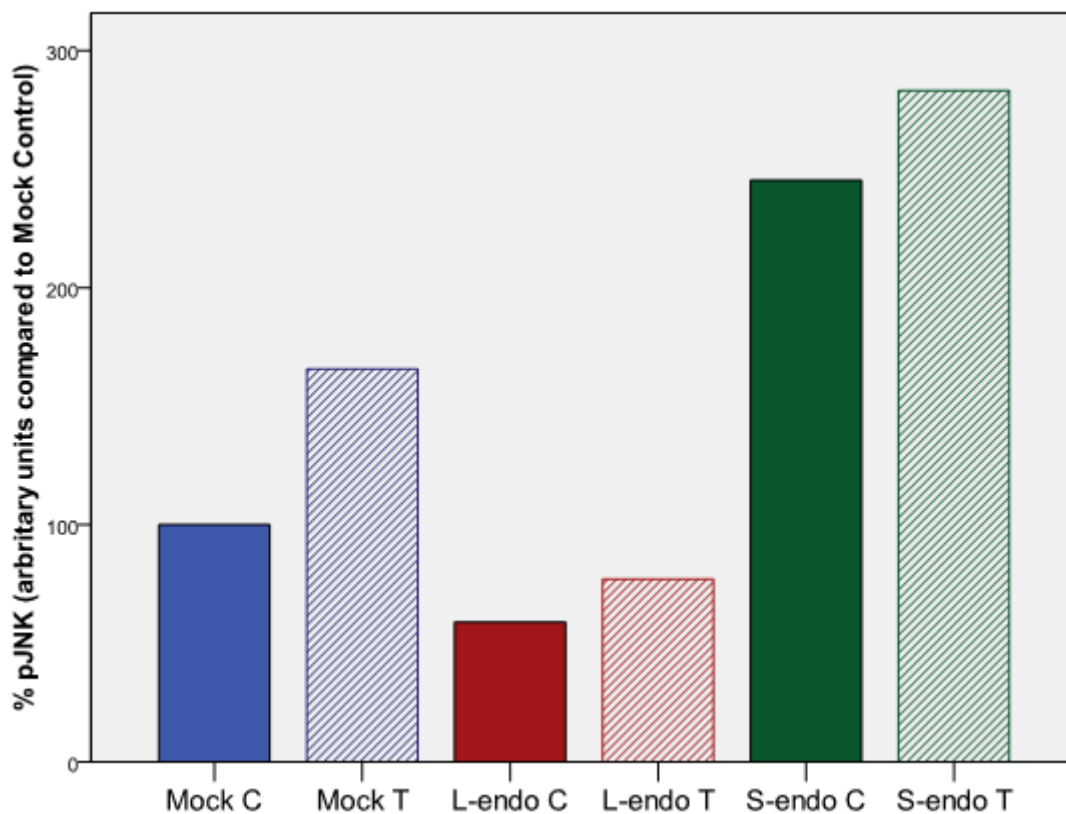
O tratamento com TGF- $\beta$  (25 pM durante 30 minutos) aumenta a activação de JNK nos mioblastos Mock, L- e S-endoglina. As possíveis diferenças devem-se, de novo, aos limites da semiquantificação pela técnica de *Western Blot*. A activação de S-endoglina ultrapassa os limites de detecção. Os valores reais da activação da JNK em células que expressam S-endoglina são maiores do que os representados (Fig. 44 e 45).

Não existem alterações significativas a nível da expressão de JNK, quer por

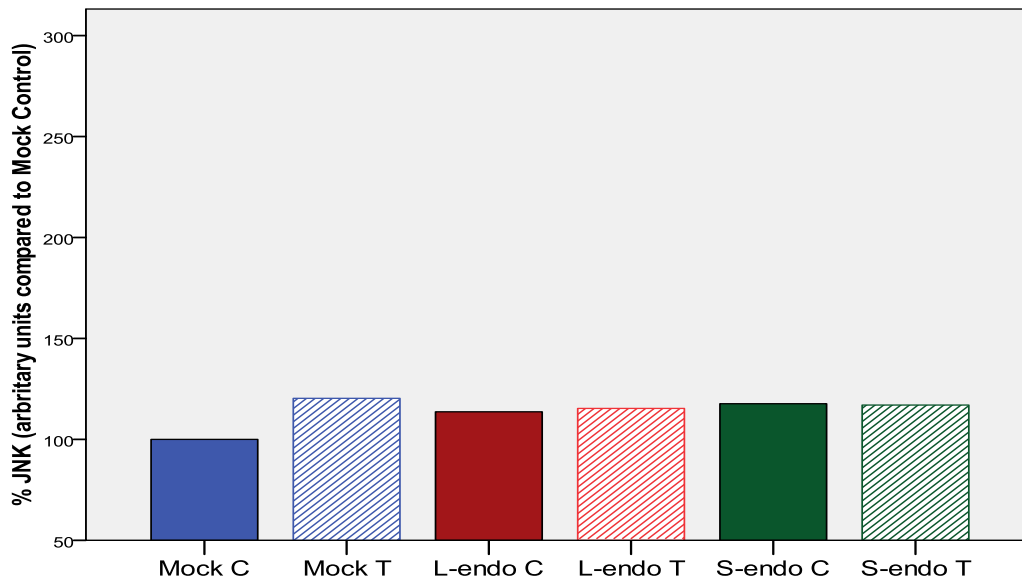
tratamento com TGF- $\beta$ , quer entre mioblastos Mock, L- e S-endoglina (Fig. 46). As cargas foram controladas com tubulina (Fig. 47).



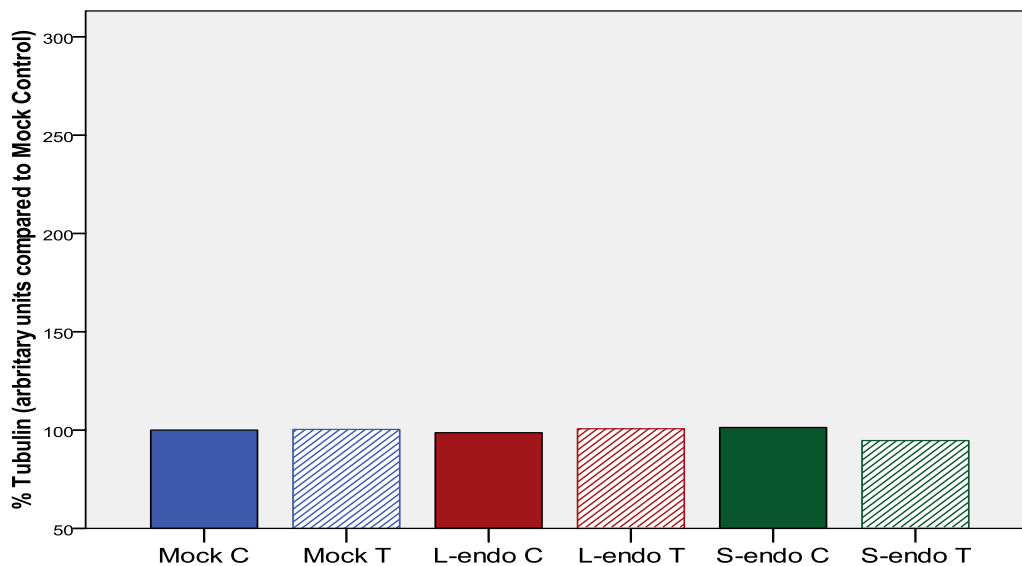
**Fig. 44. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão e fosforilação de JNK em mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina.** Os mioblastos foram privados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. As determinações das proteínas JNK e pJNK foram feitas por Western Blot. C = Controle, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 45. Representação gráfica do efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a fosforilação de JNK.** Os mioblastos foram privados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de JNK foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de fosfo-JNK. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controle, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 46. Representação do efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão de JNK.** Os mioblastos foram deprivados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de JNK foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de JNK. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 47. Controlo de carga de JNK e fosfo-JNK com tubulina.** A determinação de tubulina foi feita por Western Blot e recurso a anticorpo anti-tubulina de rato. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de tubulina. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .

### 3.3 Expressão e fosforilação de p38

A via de sinalização das TGF- $\beta$  Não Smad que activa a MAPK p38 é a mesma que resulta na activação da JNK. A interacção da proteína TRAF6 com o TGF- $\beta$  induz a activação da TAK1, que vai activar as duas vias, das p38 e JNK. A diferença encontra-se nas MKKs que fosforilam p38, as MKKs 3/6 (Zhang 2009). A influência da endogлина sobre a via Não Smad das TGF- $\beta$  responsável pela activação de p38 é desconhecida

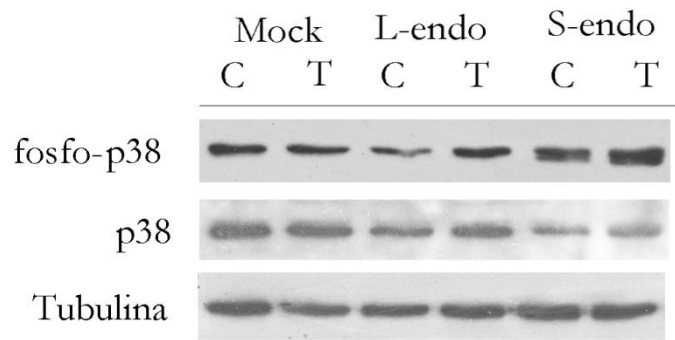
Os nossos resultados anteriores não revelavam alteração da activação de p38 na presença de L-endogлина. Embora fossem detectadas ligeiras diferenças, a conclusão foi que não existem modificações da activação de p38 devido à acção da endogлина (Rodriguez-Barbero *et al.* 2006). Este novo estudo elucida um pouco mais sobre estes resultados, principalmente, o efeito da S-endogлина.

Se observarmos a fosforilação de p38 em condições basais, entre as estirpes de mioblastos Mock, L e S endogлина, existem pequenas diferenças. No entanto, a análise por *Western Blot* sugere uma ligeira redução da fosforilação de p38 por L-endogлина e um pequeno aumento da fosforilação de p38 nos mioblastos S-endogлина (Fig. 48 e 49).

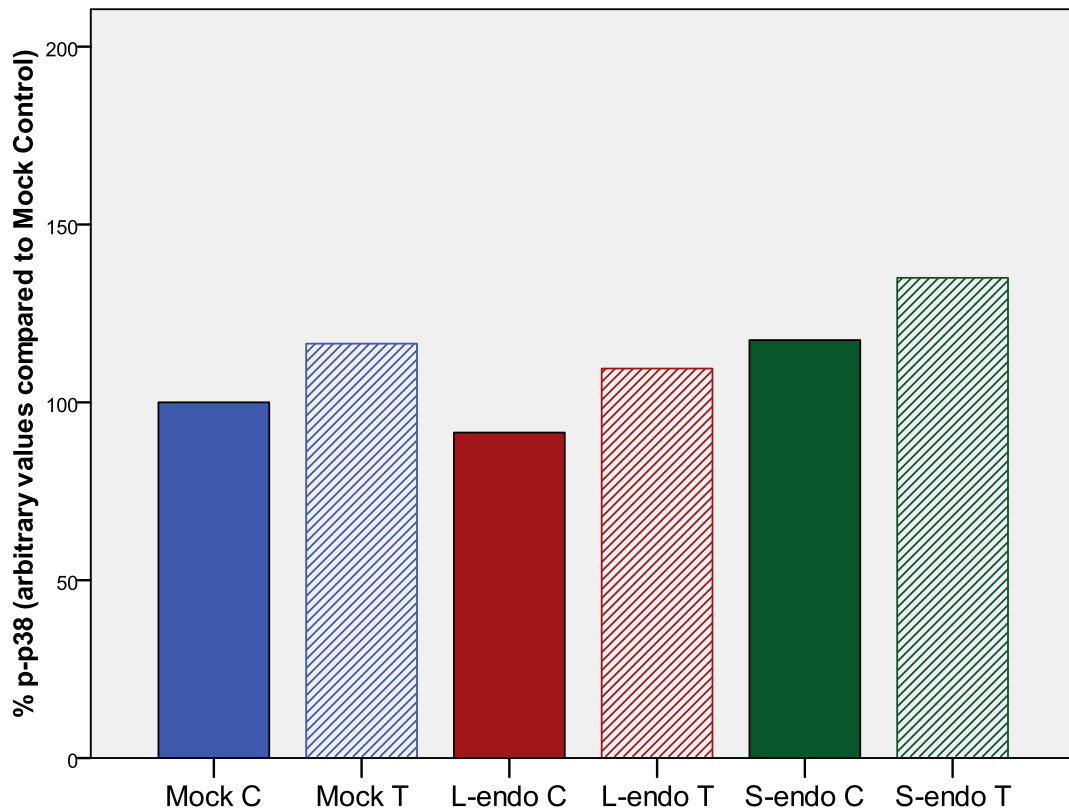
Realizando o tratamento com TGF- $\beta$  (25 pM durante 30 minutos), observa-se que nos três tipos celulares existe activação da p38 induzida pela TGF- $\beta$  (Fig. 49).

A expressão de p38 mantém-se nos mesmos níveis nos mioblastos Mock e L, embora existe uma importante redução causada pela S-endogлина. Uma vez que esta regulação à nível da expressão ocorre apenas nas p38 na presença de S-endogлина, deve ter um efeito sobre ligandos e/ou factores de transcrição exclusivos da p38. A quantificação do ARN por PCR poderá elucidar se de facto, a S-endogлина afecta a expressão de p38 a nível nuclear.

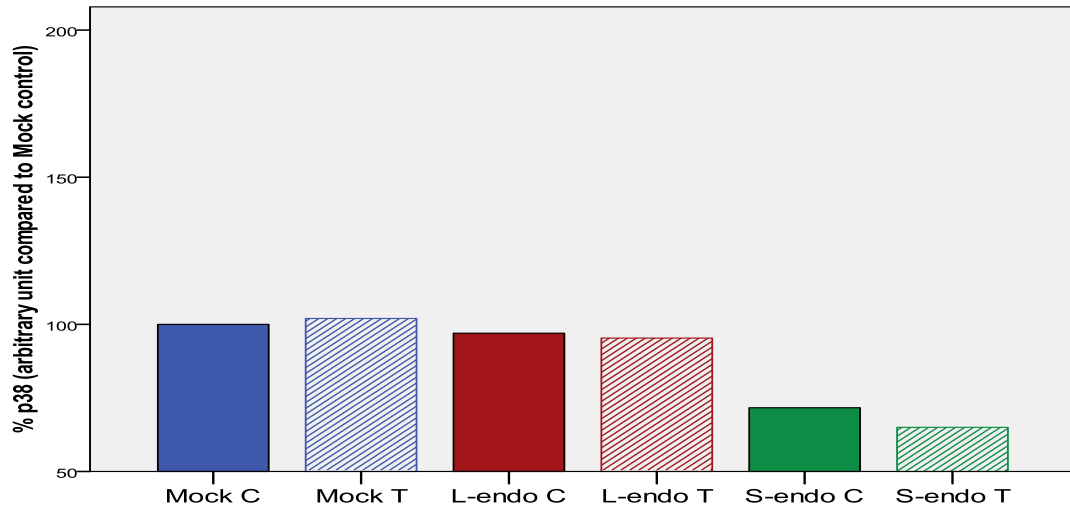
Devido às diferenças de expressão que se observam na presença de S-endogлина, é interessante observar a activação de p38 em proporção com a expressão de p38 (Fig. 51). Quando foi comparada com a expressão de p38, observou-se que existe grande activação de p38 em mioblastos que expressam S-endogлина, mesmo na ausência de TGF- $\beta$ . O tratamento com TGF- $\beta$  conduziu a um novo aumento da activação de p38 (Fig. 51).



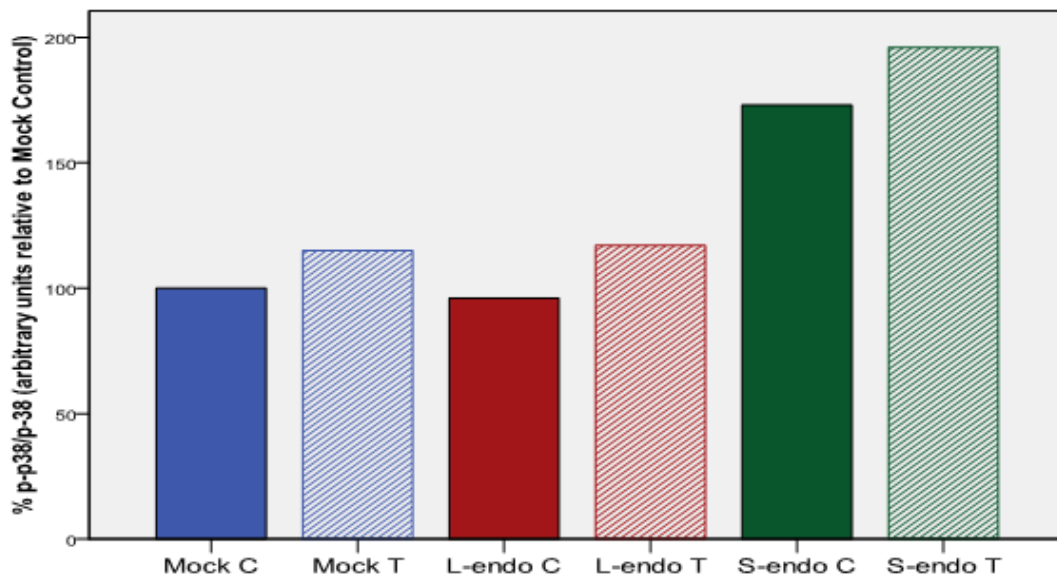
**Fig. 48. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão e fosforilação de p38 em mioblastos Mock, L-endogлина e S-endogлина.** Os mioblastos foram privados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. As determinações das proteínas fosfo-p38 e p38 foram feitas por Western Blot. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



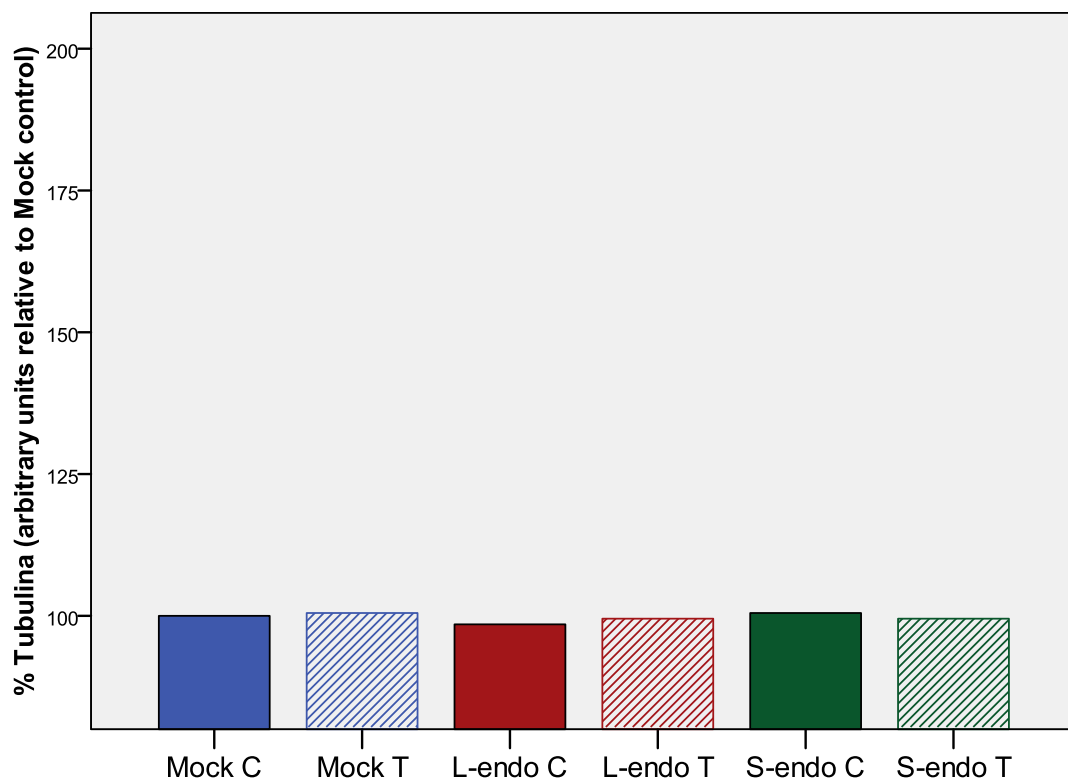
**Fig. 49. Representação feito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a activação de p38.** Os mioblastos foram privados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de JNK foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de fosfo-p38. Os resultados estão expressos em percentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 50. Representação do efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a expressão de p38.** Os mioblastos foram deprivados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de p38 foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de p38. Os resultados estão expressos em percentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



**Fig. 51. Representação da activação de p38 em função da expressão de p38.** Os mioblastos foram deprivados de soro durante 24 horas, sendo tratados com 25 mM de TGF- $\beta$  durante 30 minutos e posteriormente lisados. A determinação de p38 foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de p-p38 em relação à p38. Os resultados estão expressos em percentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .



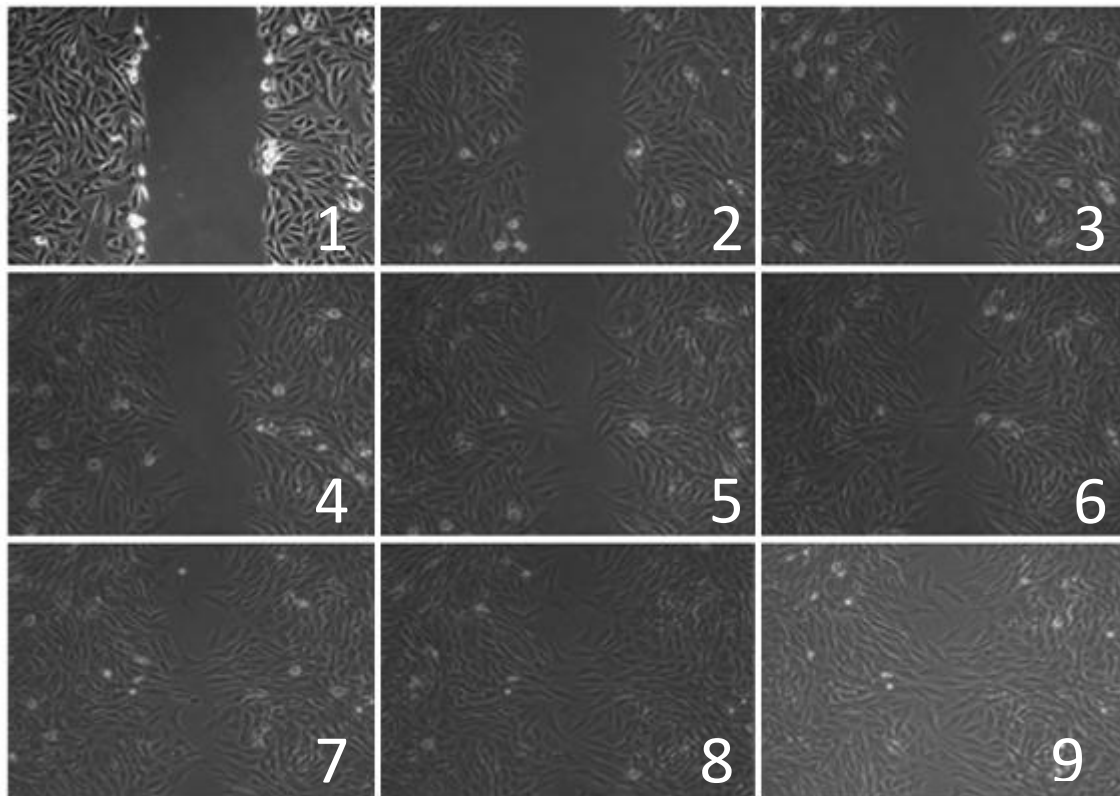
**Fig. 52. Controlo de carga de p38 e fosfo-p38 com tubulina.** A determinação de tubulina foi feita por Western Blot. Representação em gráfico de barras corresponde à semiquantificação através de *Scion Image* de tubulina. Os resultados estão expressos em percentagem em relação à quantidade presente nos mioblastos Mock em estado basal. Os dados, obtidos a partir de três experimentos diferentes, são bastante semelhantes. No entanto, aqui só se encontra representado os relativos a um resultado. C = Controlo, T = TGF- $\beta$ .

## 4. Ensaio de Migração

### 4.1 Microscopia de Célula Viva

84

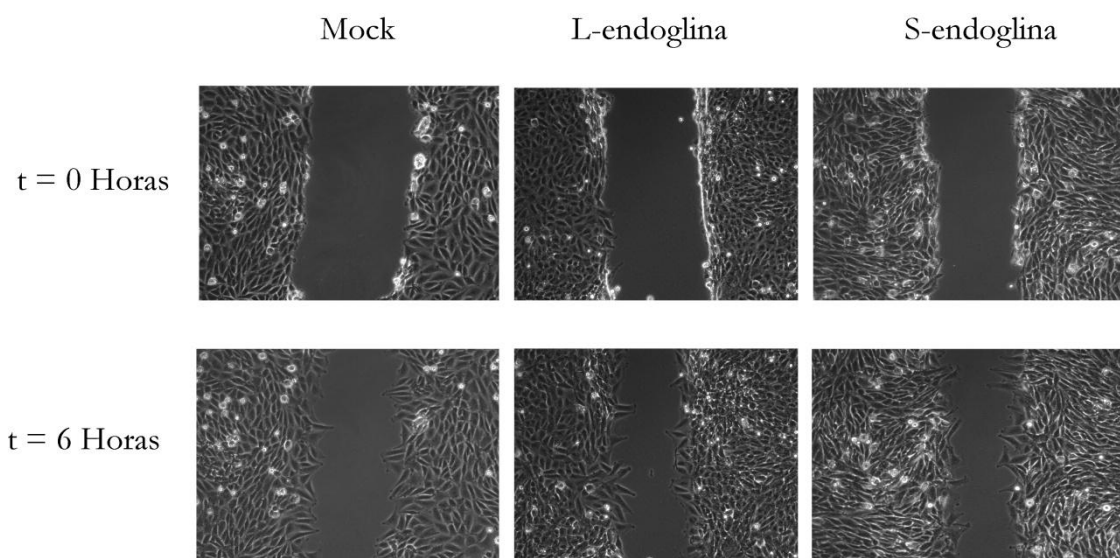
Analisamos o efeito da expressão de endoglina na migração observando os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> Mock, L- e S-endoglina. Os estudos sobre a migração das diferentes células, mioblastos Mock, S-endoglina e L-endoglina realizaram-se com um microscópio de célula viva, observando as células durante 24 horas. As células foram “feridas” com uma pipeta de Pasteur e colocadas em condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) no microscópio de célula viva Axiovert 200, sendo fotografadas a intervalos de 15 minutos. Com as fotografias foi montada uma película de 48 horas, onde se pode estudar o encerramento da ferida. Na Fig.53 pode-se observar uma representação das fotografias desta película. Desses estudos de 24 horas, observamos que as maiores diferenças de migração entre as três linhas celulares ocorrem às primeiras 6 horas de migração. Neste período, as cinéticas de migração variam conforme as estirpes celulares.



**Fig. 53. Wound-Healing.** As células foram “feridas” com uma pipeta de Pasteur e colocadas em condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) no microscópio de célula viva Axiovert 200 durante 48 horas, sendo fotografadas a intervalos de 15 minutos. Com as fotografias foi montada uma película de 48 horas, onde se pode estudar o encerramento da ferida.

Com as fotografias foi montada uma película de 48 horas, onde se pode estudar o encerramento da ferida. Na fig.53 pode-se observar uma representação das fotografias desta película. Nestes estudos de 24 horas, observamos que as maiores diferenças de migração entre as três linhas celulares ocorrem às primeiras 6 horas de migração. Neste período, as cinéticas de migração variam conforme as estirpes celulares.

Estudando a migração de células Mock, S-endoglina e L-endoglina ao longo dum período de 6 horas, foi possível observar que a estirpe de mioblastos L-endoglina possui uma maior cinética de migração, sendo o tipo de células com mais capacidade de migração nesse espaço de tempo (Fig. 54 e Tabela 5.)



**Fig. 54. Estudo da migração das mioblastos Mock, L-endoglina e S-endoglina através de wound-healing.** As células foram “feridas” com uma pipeta de Pasteur e colocadas em condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) no microscópio de célula viva Axiovert 200 durante 6 horas, sendo fotografadas a intervalos de 15 minutos.

Estes resultados coincidem com estudos anteriores, que sugerem um papel da L-endoglina na regulação da invasividade, agressividade e formação de metástases por tumores, assim como regulador da função bivalente da via de sinalização dos TGF- $\beta$  (Uneda *et al.* 2009). No entanto, outros estudos realizados sobre a isoforma L-endoglina sugerem que é como um promotor da proliferação, malignidade e capacidade de invasão em cancros da mama. Mais detalhes e extrapolações requerem um acompanhamento da capacidade de migração das células Mock, S-endoglina e L-endoglina ao longo de um maior período de tempo. No entanto, estes resultados iniciais são interessantes, e dão maior

confiança à noção que a S-endogлина poderá ser uma boa ferramenta contra a invasividade tumoral (Liu *et al.* 2002; Dallas *et al.* 2008; Oxmann *et al.* 2008).

**Tabela 5. Distância migrada e cinética de migração de mioblastos em microscopia de célula viva.** As células foram “feridas” com uma pipeta de Pasteur e colocadas em condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) no microscópio de célula viva Axiovert 200 durante 6 horas, sendo fotografadas a intervalos de 15 minutos.

Mioblastos (n=3)	Distância Migrada ( $\mu\text{m}$ )	Cinética de Migração ( $\mu\text{m}/\text{hora}$ )
Mock	79	13,2
<b>L-endogлина</b>	92,6	15,4
<b>S-endogлина</b>	76,5	12,8

Com estes dados, decidimos aprofundar o estudo da migração utilizando uma tecnologia que nos permite discriminar de uma forma precisa as diferenças entre as linhas celulares. Observamos que os mioblastos migram pouco, o que torna mais difícil o estudo das diferenças entre Mock, L- e S-endogлина, requerendo o uso de outras técnicas mais sensíveis que permitam detectar e comparar pequenas diferenças. Apesar das limitações do método, estes resultados foram animadores e incentivam à elaboração de mais estudos de migração, confirmando o interesse de tentar deduzir o modo como as diferentes isoformas de endogлина afectam os processos de migração.

## 5. Ensaio de Reparação

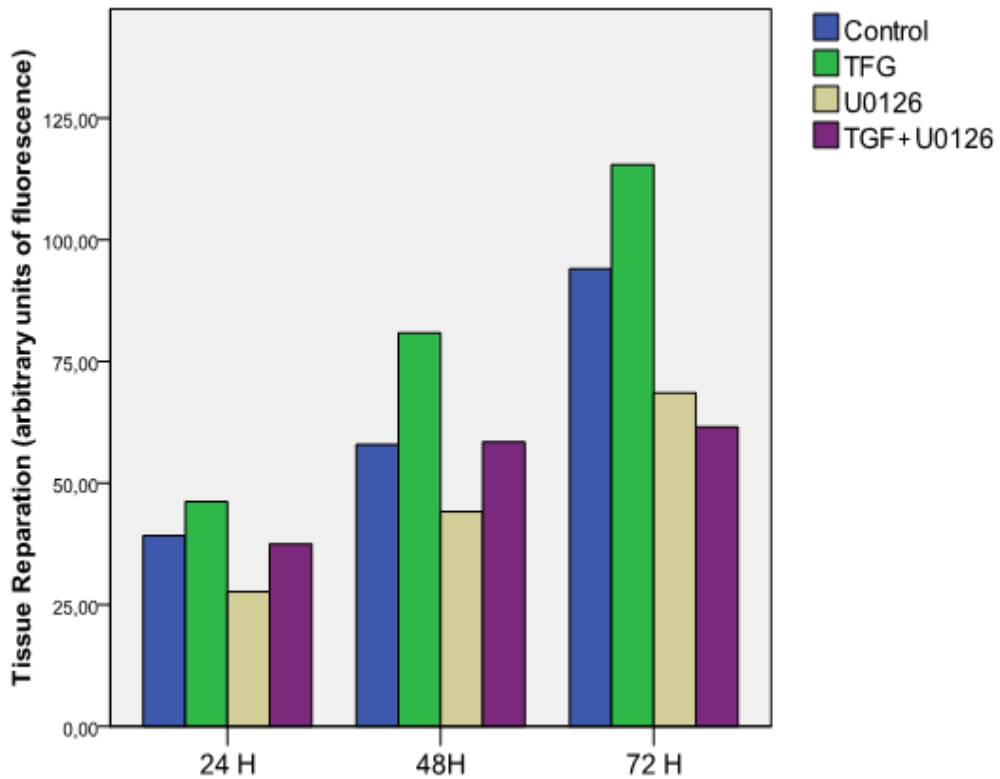
Confrontados com as limitações da microscopia de célula viva, decidimos utilizar uma nova metodologia experimental, adaptando outra técnica para estudo da reparação de tecidos. Como este estudo se foca nas interações entre as vias do TGF- $\beta$  e da MAPK reguladas e mediadas por S-endoglina e L-endoglina, as MAPKS ERK, JNK e p38 são candidatos perfeitos para acompanhar e estudar o efeito da endoglina no processo de migração. Os interessantes resultados obtidos com a fosforilação de ERK (Fig. 40 e 41), levaram a aprofundar nesse sentido na primeira análise. O U0126 é um inibidor altamente selectivo da MEK1 e da MEK 2, que são cinases de ERK. Como tal, possui a capacidade de inibir sinalização da via MEKs/ERKs (Favata *et al.* 1998).

A técnica de *stoppers* e criação de zonas de detecção é um método novo para analisar a capacidade de reparação de tecidos dos mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> Mock, L- e S-endoglina. No entanto, sendo um método novo, utilizando um corante nunca utilizado neste tipo celular, foram necessários vários ensaios de aperfeiçoamento da técnica.

O *CellTracker<sup>TM</sup> Orange*, utilizado como corante, permite corar células vivas sem as danificar, dependendo de transformação a nível intracelular para emitir fluorescência. No entanto, o uso de concentrações demasiado baixas pode implicar a sua degradação durante a realização dos ensaios. Por outro lado, concentrações demasiado elevadas podem induzir alterações do metabolismo celular. Realizando ensaios com várias concentrações, determinamos como óptima a concentração de 10 mM de *CellTracker<sup>TM</sup> Orange*. Outro afinamento necessário foi a eleição da quantidade de células semeada que fosse a mais adequada para os ensaios de reparação de tecidos. A concentrações demasiado baixas as células proliferam e migram para os espaços entre elas, e uma concentração demasiado elevada provoca que as células proliferem demasiado existindo sobreposição de umas células sobre as outras, o que implica uma capacidade de reparação de tecidos diminuída.

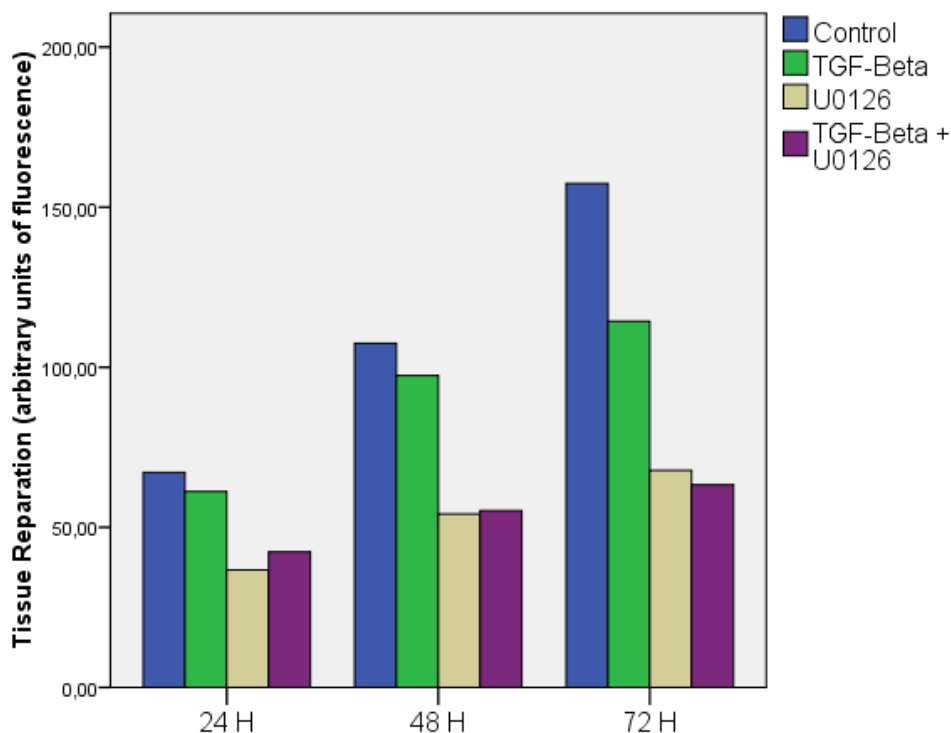
Após os ensaios de reparação, observamos que nas células Mock existe um aumento da migração ao longo do tempo em condições basais, provando que ocorre reparação mesmo na ausência de sinais extracelulares. Após tratamento com TGF- $\beta$  evidenciou-se um aumento da reparação de tecidos que se mantém constante durante 72 horas. O inibidor U0126 reduz os processos de reparação celular para níveis inferiores aos obtidos nos controlos. Esta observa-se ao longo de 72 horas e torna-se mais evidente ao longo do tempo. Após tratamento conjugado de TGF- $\beta$  e U0126, os mioblastos Mock

apresentam redução da reparação, contudo, esta é apenas evidenciável ao fim de 72 horas e inferior ao controlo e ao tratamento de TFG- $\beta$  (Fig. 55).



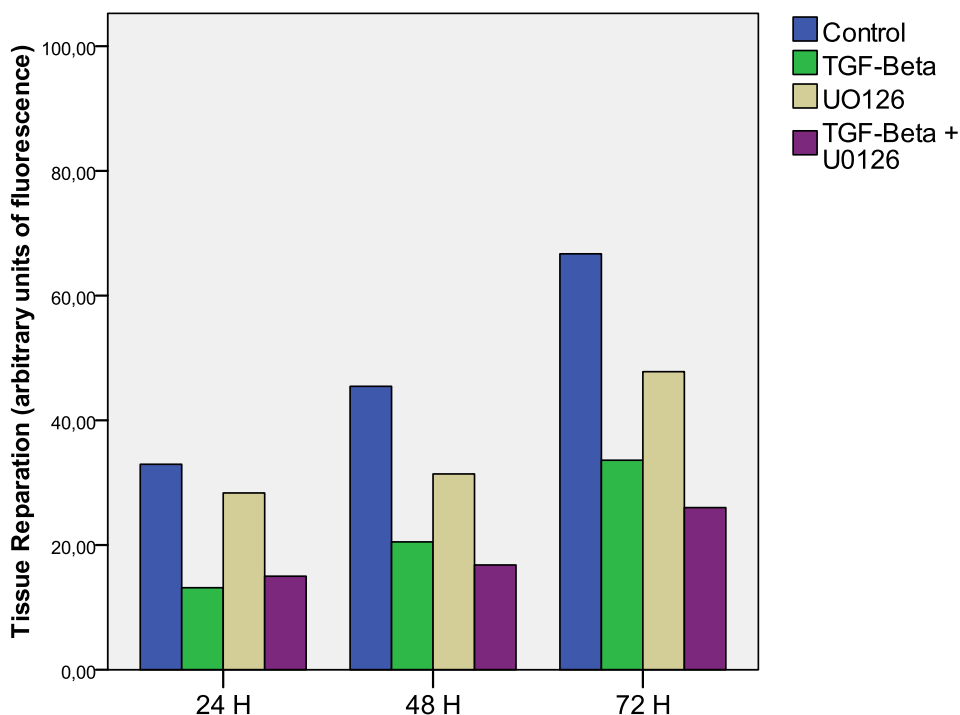
**Fig. 55. Estudo da migração de mioblastos Mock com tratamentos com TGF- $\beta$  e inibidor de MEKs U0126.** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 12 horas. As células foram coradas com CellTracker Orange 10  $\mu$ M. Durante os tratamentos, células foram tratadas durante 30 minutos com 25  $\mu$ M de U0126 durante 30 minutos. Após esses 30 minutos tratou-se as células com TGF- $\beta$  25 pM. As células foram incubadas a condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A fluorescência celular foi determinada em intervalos de 24 horas num Leitor Fluoroskan Ascent FL à excitação de 538 nm e emissão de 604 nm. n = 2.

Nos mioblastos L-endoglina observamos reparação de tecido mesmo em condições controlo ao longo do período de 72 horas. O TGF- $\beta$  diminui a reparação ao longo dos três dias, fenómeno que se acentua às 72 horas. O tratamento com o U0126 reduz os processos de reparação celular nas células L-endoglina de forma progressiva ao longo de 72 horas, a reparação sendo inferior ao controlo e ao tratamento com TGF- $\beta$ . No tratamento conjugado de TGF- $\beta$  e U0126, os mioblastos L-endoglina apresentam redução da reparação, contudo, sem diferenças daquela induzida por U0126 isolado, esta redução estando ao mesmo nível da inibição da via MEK/ERK (Fig. 56).



**Fig. 56. Estudo da migração de mioblastos L-endoglina com tratamentos com TGF- $\beta$  e inibidor de MEKs U0126.** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 12 horas. As células foram coradas com CellTracker Orange 10  $\mu$ M. Durante os tratamentos, células foram tratadas durante 30 minutos com 25  $\mu$ M de U0126 durante 30 minutos. Após esses 30 minutos tratou-se as células com TGF- $\beta$  25  $\mu$ M. As células foram incubadas a condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A fluorescência celular foi determinada em intervalos de 24 horas num Leitor Fluoroskan Ascent FL à excitação de 538 nm e emissão de 604 nm. n =2.

Nos mioblastos S-endoglina, em condições controlo, observa-se reparação dos tecidos ao longo das 72 horas. Quando tratadas com TGF- $\beta$ , existe uma importante redução da reparação, que se verifica constante ao longo das 72 horas. A inibição da via das ERK reduz os processos de reparação, contudo, esta redução é inferior à despoletada por TGF- $\beta$ . Após tratamento conjugado de TGF- $\beta$  e inibidor U0126, observa-se uma inibição aditiva, superior do que em ambos os casos isolados, ocorrendo menos reparação que nas condições controlo, tratamento com TGF- $\beta$  e tratamento com U0126 (Fig. 57).



**Fig. 57. Estudo da migração de mioblastos S-endoglina com tratamentos com TGF- $\beta$  e inibidor de MEKs U0126.** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 12 horas. As células foram coradas com CellTracker Orange 10  $\mu$ M. Durante os tratamentos, células foram tratadas durante 30 minutos com 25  $\mu$ M de U0126 durante 30 minutos. Após esses 30 minutos tratou-se as células com TGF- $\beta$  25 pM. As células foram incubadas a condições de manutenção (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A fluorescência celular foi determinada em intervalos de 24 horas num Leitor Fluoroskan Ascent FL à excitação de 538 nm e emissão de 604 nm. n = 2.

Os estudos de restauração confirmam a importância da via das ERKs na migração, uma vez que inibição da via das ERKs causada pelo inibidor U0126 resulta numa inibição da migração. No entanto, como participam o TGF- $\beta$  e a endoglina na regulação deste processo requer maior discussão.

Quando comparamos a reparação entre os mioblastos Mock, L e S endoglina, o primeiro dado que sobressai é a aparente maior reparação dos mioblastos L-endoglina durante os três dias, seguida pelas células Mock. A reparação é menor na S-endoglina (Fig. 55 – 57). Estas linhas celulares apresentam importantes diferenças proliferativas e na produção/degradação de matriz celular, diferenças que ocorrem tanto na ausência e na presença de soro. Assim, os mioblastos L-endoglina proliferam mais que os mioblastos Mock e os mioblastos S-endoglina proliferam menos (Obreo *et al.* 2004; Velasco *et al.* 2008). Em ensaios de migração, usualmente usa-se um meio de cultura deprivado de soro e/ou com inibidores do citoesqueleto. Contudo, uma vez que as células L-endoglina continuam a proliferar na ausência de soro e inibidores do citoesqueleto iriam afectar os

nossos ensaios, nenhum destes métodos foi aplicado. Como tal, migração não é o único processo estudado – também estão envolvidos proliferação, produção de matriz celular e outros processos. A este conjunto de processos decidimos apresentar como processos de reparação de tecido.

Os resultados indicam que o TGF- $\beta$  induz a reparação nos mioblastos Mock, mas na presença de L- ou S-endoglina, TGF- $\beta$  reduz estes processos (Fig. 55 – 57). Contudo, o papel do TGF- $\beta$  não é de todo igual nos mioblastos L- e S-endoglina. Nas células L-endoglina, a redução da reparação induzida pelo TGF- $\beta$  não é clara entre as 24-48 horas, tornando-se evidente apenas às 72 horas. Nos mioblastos S-endoglina, esta diminuição é mais evidente e regular, observando-se imediatamente às 24 horas e verificando-se ao longo das seguintes medições.

O inibidor da via MEKs/ERKs reduz a reparação nos três tipos celulares (Fig. 55-57). Nos mioblastos Mock e L-endoglina, a inibição da via das ERKs reduz a reparação abaixo do controlo e do tratamento com TGF- $\beta$ . Nas células que expressam S-endoglina, a redução induzida por U0126 é mantêm os processos de reparação abaixo do controlo, mas acima da reparação na presença de TGF- $\beta$ 1.

A conjugação entre o TGF- $\beta$ 1 e o U0126 produz resultados bastante diferentes na presença ou ausência de S-endoglina (Fig. 55 e 57). Nos mioblastos Mock e L-endoglina, o tratamento conjugado resulta numa reparação igual à mesma que ocorre na inibição da via das MEKs/ERKs. Na S-endoglina, o tratamento conjugado apresenta uma reparação inferior ao tratamento com o TGF- $\beta$ 1 ou o U0126. Este dado não só fortalece a hipótese de que a endoglina regula o carácter bifuncional do TGF- $\beta$ 1 sobre a migração, como estabelece que a sua influência reguladora não se limita apenas às vias canónicas de sinalização: L e S endoglina influenciam e regulam a interacção do TGF- $\beta$ 1 sobre vias de sinalização Não Smad/sinalização cruzada que partilham ligandos com a via das MAPKs.

## 6. Resumo da Discussão

Os resultados deste trabalho sugerem que, em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, é possível observar a activação da via de MAPKs induzida pelo TGF- $\beta$ 1, mesmo a baixas concentrações, sendo este modelo adequado para o estudo de pequenas variações causadas pela presença da L- ou S-endoglina. A expressão da S-endoglina em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> aumenta a activação das MAPKs ERK, JNK e p38. Em oposição, a expressão da L-endoglina diminui a activação das três MAPKs.

Estudos prévios com mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> que expressam L-endoglina sugeriram que em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> L-endoglina existe redução da activação de ERK e p38 (Rodríguez-Barbero *et al.* 2006). Estes dados coincidem com os nossos resultados que sugerem um efeito reductor da activação de p38, JNK e ERK pela L-endoglina.

O tratamento com TGF- $\beta$ 1 induz a fosforilação das MAPKs ERK, JNK e p38 nos mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> Mock, L-endoglina e S-endoglina. A influência da via do TGF- $\beta$  sobre as MAPKs é conhecida, sabendo-se que aumenta a fosforilação de MAPKs (Mulder 2000). Os nossos resultados sugerem que a presença ou ausência de endoglina não altera a activação de MAPKs por TGF- $\beta$ .

A expressão de L- ou S-endoglina não modifica a expressão de ERK e JNK, quer na presença ou ausência de endoglina, quer após tratamento com TGF- $\beta$ . No entanto, S-endoglina reduz a expressão de p38. Isto ocorre independentemente de TGF- $\beta$ . Para confirmar estes resultados, seria útil estudar a expressão de p38 através do método de PCR, de modo a averiguar se, de facto, S-endoglina, por um mecanismo independente de TGF- $\beta$ , regula a expressão de p38.

Nos ensaios de migração por *wound-healing*, observamos que L-endoglina aumenta a migração, enquanto S-endoglina a diminui. Contudo, os mioblastos são células que apresentam baixas cinéticas de migração. Os desafios colocados pela modesta migração dos mioblastos levam à elaboração e aperfeiçoamento de uma técnica inédita: estudo da reparação de tecidos através da criação de uma zona de detecção, usando um corante fluorescente de célula viva, não tóxico, que permita detectar e quantificar por fluorescência as células que se deslocam durante o processo de reparação celular.

Tanto nos ensaios de reparação como nos ensaios de *wound-healing* como nos de migração, observamos que os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> que expressam L-endoglina apresentam maior migração quando comparados com os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> Mock. Os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> que expressam S-endoglina apresentam menor migração que os mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> Mock.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, concluímos que a expressão da L-endoglina e da S-endoglina em mioblastos  $L_6E_9$  afecta proliferação e produção e matriz extracelular (Obreo *et al.* 2004; Rodriguez-Barbero *et al.* 2006; Velasco *et al.* 2008). O nosso grupo elaborou um modelo que sugere que L-endoglina e S-endoglina regulam a via clássica de sinalização de TGF- $\beta$  em mioblastos  $L_6E_9$ . L-endoglina favorece a via de ALK1, activação de Smad 1/5, conduzindo a um aumento da proliferação/migração e diminuição da produção de matriz extracelular. S-endoglina favorece a via de ALK5, activação de Smad 2/3, conduzindo a uma diminuição da proliferação/migração e um aumento da produção de matriz extracelular (Velasco *et al.* 2008). Os nossos resultados de migração e reparação enquadram-se neste modelo.

Na ausência de endoglina, TGF- $\beta$  favorece processos de reparação. Quando os mioblastos  $L_6E_9$  expressam L-endoglina ou S-endoglina, é possível observar que TGF- $\beta$  possui uma função inibitória dos processos de reparação. Este efeito inibitório parece ser mais incisivo nas células S-endoglina.

O controlo da proliferação/migração e da produção de matriz celular dependem de um equilíbrio preciso entre activação das vias ALK1/ALK5, as duas isoformas de endoglina deslocando o equilíbrio em sentidos opostos. Os mioblastos Mock, como não expressam endoglina, assume-se que estão em equilíbrio entre ALK1/ALK5. Tratamento com TGF- $\beta$  diminui a reparação em mioblastos que expressam L-endoglina, ao contrário do que é esperado no modelo de Velasco *et al.* Tal como nos modelos de Goumans e Lamouille, estas diferenças podem dever-se à concentração do TGF- $\beta$ , a sua função sendo diferente a baixas concentrações (Goumans *et al.* 2002; Lamouille *et al.* 2002). S-endoglina activa a via ALK5, que reduz a migração e proliferação, os processos de reparação sendo reduzidos com a adição de TGF- $\beta$ , algo que se enquadra no modelo de Velasco *et al.*

Nos estudos da activação das MAPKs, observamos que L-endoglina diminui a fosforilação de ERK, enquanto S-endoglina aumentava a fosforilação desta MAPK. Inibição da via MEKs/ERKs reduz a migração nas linhas de mioblastos Mock, L- e S-endoglina. O papel de ERK sobre a migração é bem documentado, influenciando os processos de migração e a adesão célula-célula, favorecendo a migração celular (Nguyen *et al.* 1999; Ray *et al.* 2007). A diminuição dos processos de reparação mediante inibição da via MEKs/ERKs coincide com este papel da via das ERKs.

Inibição da via MEKs/ERKs indica o quão é importante esta via é para a regulação de processos envolvidos na reparação de tecidos. No entanto, foi provado por nós que L- e S-endoglina influenciam a via das JNK e p38. Novos experimentos, contendo inibidores

destas duas vias podem elucidar muito sobre o papel de MAPKs induzidas por TGF- $\beta$  e reguladas por endoglinina nos processos de reparação de tecidos.

Em suma, seriam necessários mais estudos para aprofundar sobre os mecanismos exactos da L- e S-endoglinina. Para além disso, apenas estudamos o efeito sobre a ERK. Também seria importante estudar o papel de JNK e p38 nos processos de reparação de tecidos.

*"There are many hypotheses in science that are wrong.  
That's perfectly all right; it's the aperture to finding  
out what's right. Science is a self-correcting process."*

**-Carl Sagan-**

## *Conclusões*



Após discussão destes resultados, comparações entre os dados obtidos entre diferentes métodos e exploração e estudo aprofundado da literatura publicada sobre o nosso campo de estudo, podemos chegar às seguintes conclusões:

- A expressão de L- e S-endoglina em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> interage com as vias das MAPKs ERK/JNK/p38 independentemente de TGF- $\beta$ , mas possui diferentes efeitos sobre a activação de MAPKs. A expressão de L- e S-endoglina regula activação de MAPKs, a L-endoglina diminuindo-a e a S-endoglina aumentando-a.
- Baixas concentrações de TGF- $\beta$  induzem a activação de MAPKs ERK/JNK/p38 em mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, com ou sem expressão de L- ou S-endoglina.
- A expressão de L-endoglina aumenta a migração celular em etapas iniciais e a expressão de S-endoglina diminui a migração.
- O papel dualista do TGF- $\beta$  na reparação de tecido é dependente da expressão de endoglina. O TGF- $\beta$  aumenta a reparação na ausência de endoglina e diminui a reparação na presença de L- ou S-endoglina.

*"For us, there is no longer a fundamental mystery about Life.  
It is all the process of extraordinary eruptions of information."*

**-Douglas Adams-**

# *Bibliografia*



- Abdalla, S. A. and M. Letarte (2006) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* **43**, 97-110.
- Adam, P. J., G. J. Clesham and P. L. Weissberg (1998) Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **247**, 33-7.
- Altomonte, M., R. Montagner, E. Fonsatti, F. Colizzi, I. Cattarossi, L. I. Brasoveanu, M. R. Nicotra, A. Cattelan, P. G. Natali and M. Maio (1996) Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer.* **74**, 1586-91.
- Anscher, M. S., W. P. Peters, H. Reisenbichler, W. P. Petros and R. L. Jirtle (1993) Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med.* **328**, 1592-8.
- Arthur, H. M., J. Ure, A. J. Smith, G. Renforth, D. I. Wilson, E. Torsney, R. Charlton, D. V. Parums, T. Jowett, D. A. Marchuk, J. Burn and A. G. Diamond (2000) Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol.* **217**, 42-53.
- Atfi, A., K. Lepage, P. Allard, A. Chapdelaine and S. Chevalier (1995) Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 12110-4.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana and M. Letarte (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* **274**, 584-94.
- Bellon, T., A. Corbi, P. Lastres, C. Cales, M. Cebrian, S. Vera, S. Cheifetz, J. Massague, M. Letarte and C. Bernabeu (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* **23**, 2340-5.
- Bernabeu, C., J. M. Lopez-Novoa and M. Quintanilla (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1792**, 954-73.
- Blanco, F. J., J. F. Santibanez, M. Guerrero-Esteo, C. Langa, C. P. Vary and C. Bernabeu (2005) Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol.* **204**, 574-84.
- Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene.* **20**, 6482-91.
- Buhring, H. J., C. A. Muller, M. Letarte, A. Gougos, A. Saalmuller, A. J. van Aghoven and F. W. Busch (1991) Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia.* **5**, 841-7.
- Chaiworapongsa, T., R. Romero, J. P. Kusanovic, P. Mittal, S. K. Kim, F. Gotsch, N. G. Than, S. Mazaki-Tovi, E. Vaisbuch, O. Erez, L. Yeo, S. S. Hassan and Y. Sorokin Plasma soluble endoglin concentration in pre-eclampsia is associated with an increased impedance to flow in the maternal and fetal circulations. *Ultrasound Obstet Gynecol.* **35**, 155-62.
- Chang, L. and M. Karin (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* **410**, 37-40.
- Cheifetz, S., T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massague and M. Letarte (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* **267**, 19027-30.
- Chin, B. Y., A. Mohsenin, S. X. Li, A. M. Choi and M. E. Choi (2001) Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* **280**, F495-504.
- Chow, J. Y., K. T. Quach, B. L. Cabrera, J. A. Cabral, S. E. Beck and J. M. Carethers (2007) RAS/ERK modulates TGFbeta-regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis.* **28**, 2321-7.

- Coker, R. K., G. J. Laurent, P. K. Jeffery, R. M. du Bois, C. M. Black and R. J. McNulty (2001) Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*. **56**, 549-56.
- Cole, S. G., M. E. Begbie, G. M. Wallace and C. L. Shovlin (2005) A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*. **42**, 577-82.
- Dallas, N. A., S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim and L. M. Ellis (2008) Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res*. **14**, 1931-7.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. **425**, 577-84.
- Diez-Marques, L., R. Ortega-Velazquez, C. Langa, A. Rodriguez-Barbero, J. M. Lopez-Novoa, S. Lamas and C. Bernabeu (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta*. **1587**, 36-44.
- Duff, S. E., C. Li, J. M. Garland and S. Kumar (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. **17**, 984-92.
- Elliott, R. L. and G. C. Blobe (2005) Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*. **23**, 2078-93.
- Fang, M., Y. He, H. Li, M. Wu, X. Shi and H. Du Alterations of serum and placental endoglin in pre-eclampsia. *J Int Med Res*. **38**, 43-51.
- Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle and J. M. Trzaskos (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. **273**, 18623-32.
- Fernandez-Ruiz, E., S. St-Jacques, T. Bellon, M. Letarte and C. Bernabeu (1993) Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*. **64**, 204-7.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987) Angiogenic factors. *Science*. **235**, 442-7.
- Fonsatti, E., M. Altomonte, M. R. Nicotra, P. G. Natali and M. Maio (2003) Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene*. **22**, 6557-63.
- Fonsatti, E., A. P. Jekunen, K. J. Kairemo, S. Coral, M. Snellman, M. R. Nicotra, P. G. Natali, M. Altomonte and M. Maio (2000) Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res*. **6**, 2037-43.
- Ghellal, A., C. Li, M. Hayes, G. Byrne, N. Bundred and S. Kumar (2000) Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res*. **20**, 4413-8.
- Goodwin, A. and G. Jenkins (2009) Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans*. **37**, 849-54.
- Gougos, A. and M. Letarte (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*. **141**, 1925-33.
- Gougos, A. and M. Letarte (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. **265**, 8361-4.
- Gougos, A., S. St Jacques, A. Greaves, P. J. O'Connell, A. J. d'Apice, H. J. Buhning, C. Bernabeu, J. A. van Mourik and M. Letarte (1992) Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol*. **4**, 83-92.
- Goumans, M. J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras and P. ten Dijke (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. **21**, 1743-53.
- Guerrero-Esteo, M., T. Sanchez-Elsner, A. Letamendia and C. Bernabeu (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem*. **277**, 29197-209.

- Guo, B., P. Rooney, M. Slevin, C. Li, S. Parameshwar, D. Liu, P. Kumar, C. Bernabeu and S. Kumar (2004) Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival. *Int J Oncol.* **25**, 285-91.
- Guo, X. and X. F. Wang (2009) Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* **19**, 71-88.
- Hasegawa, Y., S. Takanashi, Y. Kanehira, T. Tsushima, T. Imai and K. Okumura (2001) Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* **91**, 964-71.
- Hata, A., Y. Shi and J. Massague (1998) TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today.* **4**, 257-62.
- Herpin, A., C. Lelong and P. Favrel (2004) Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol.* **28**, 461-85.
- Ito, N., S. Kawata, S. Tamura, Y. Shirai, S. Kiso, H. Tsushima and Y. Matsuzawa (1995) Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **89**, 45-8.
- Jacquemyn, Y. and O. Zemtsova Risk factors and prediction of preeclampsia. *Acta Clin Belg.* **65**, 1-12.
- Jadrich, J. L., M. B. O'Connor and E. Coucouvanis (2006) The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development.* **133**, 1529-41.
- Jerkic, M., J. V. Rivas-Elena, M. Prieto, R. Carron, F. Sanz-Rodriguez, F. Perez-Barriocanal, A. Rodriguez-Barbero, C. Bernabeu and J. M. Lopez-Novoa (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* **18**, 609-11.
- Jerkic, M., J. V. Rivas-Elena, J. F. Santibanez, M. Prieto, A. Rodriguez-Barbero, F. Perez-Barriocanal, M. Pericacho, M. Arevalo, C. P. Vary, M. Letarte, C. Bernabeu and J. M. Lopez-Novoa (2006a) Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res.* **99**, 248-56.
- Jerkic, M., A. Rodriguez-Barbero, M. Prieto, M. Toporsian, M. Pericacho, J. V. Rivas-Elena, J. Obreo, A. Wang, F. Perez-Barriocanal, M. Arevalo, C. Bernabeu, M. Letarte and J. M. Lopez-Novoa (2006b) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res.* **69**, 845-54.
- Khalil, N. (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* **1**, 1255-63.
- Koleva, R. I., B. A. Conley, D. Romero, K. S. Riley, J. A. Marto, A. Lux and C. P. Vary (2006) Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* **281**, 25110-23.
- Krasagakis, K., D. Tholke, B. Farthmann, J. Eberle, U. Mansmann and C. E. Orfanos (1998) Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer.* **77**, 1492-4.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-5.
- Lamouille, S., C. Mallet, J. J. Feige and S. Bailly (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood.* **100**, 4495-501.
- Lastres, P., T. Bellon, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, A. Acevedo, A. Gougos, M. Letarte and C. Bernabeu (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol.* **22**, 393-7.
- Lastres, P., J. Martin-Perez, C. Langa and C. Bernabeu (1994) Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J.* **301 ( Pt 3)**, 765-8.
- Lebrin, F., M. Deckers, P. Bertolino and P. Ten Dijke (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* **65**, 599-608.

- Lebrin, F. and C. L. Mummery (2008) Endoglin-mediated vascular remodeling: mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med.* **18**, 25-32.
- Lee, B. H., W. Chen, S. Stippec and M. H. Cobb (2007) Biological cross-talk between WNK1 and the transforming growth factor beta-Smad signaling pathway. *J Biol Chem.* **282**, 17985-96.
- Letamendia, A., P. Lastres, L. M. Botella, U. Raab, C. Langa, B. Velasco, L. Attisano and C. Bernabeu (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* **273**, 33011-9.
- Levy, L. and C. S. Hill (2006) Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 41-58.
- Liu, Y., B. Jovanovic, M. Pins, C. Lee and R. C. Bergan (2002) Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene.* **21**, 8272-81.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-75.
- Marchuk, D. A., S. Srinivasan, T. L. Squire and J. S. Zawistowski (2003) Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet.* **12 Spec No 1**, R97-112.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **67**, 753-91.
- Massague, J. (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell.* **134**, 215-30.
- Massague, J. and Y. G. Chen (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* **14**, 627-44.
- Massague, J. and R. R. Gomis (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* **580**, 2811-20.
- McAllister, K. A., K. M. Grogg, D. W. Johnson, C. J. Gallione, M. A. Baldwin, C. E. Jackson, E. A. Helmbold, D. S. Markel, W. C. McKinnon, J. Murrell and et al. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* **8**, 345-51.
- Meurer, S. K., L. Tihaa, B. Lahme, A. M. Gressner and R. Weiskirchen (2005) Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem.* **280**, 3078-87.
- Miller, D. W., W. Graulich, B. Karges, S. Stahl, M. Ernst, A. Ramaswamy, H. H. Sedlacek, R. Muller and J. Adamkiewicz (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer.* **81**, 568-72.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* **118**, 3573-84.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2008) Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* **582**, 2051-65.
- Moustakas, A., K. Pardali, A. Gaal and C. H. Heldin (2002) Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* **82**, 85-91.
- Mulder, K. M. (2000) Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 23-35.
- Nadal-Ginard, B. (1978) Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell.* **15**, 855-64.
- Nguyen, D. H., A. D. Catling, D. J. Webb, M. Sankovic, L. A. Walker, A. V. Somlyo, M. J. Weber and S. L. Gonias (1999) Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol.* **146**, 149-64.
- O'Connell, P. J., A. McKenzie, N. Fiscaro, S. P. Rockman, M. J. Pearse and A. J. d'Apice (1992) Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol.* **90**, 154-9.
- Obreo, J., L. Diez-Marques, S. Lamas, A. Duwell, N. Eleno, C. Bernabeu, A. Pandiella, J. M. Lopez-Novoa and A. Rodriguez-Barbero (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem.* **14**, 301-10.

- Oxmann, D., J. Held-Feindt, A. M. Stark, K. Hattermann, T. Yoneda and R. Mentlein (2008) Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene*. **27**, 3567-75.
- Pardali, K. and A. Moustakas (2007) Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1775**, 21-62.
- Parker, W. L., M. B. Goldring and A. Philip (2003) Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. *J Bone Miner Res*. **18**, 289-302.
- Pepper, M. S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*. **8**, 21-43.
- Pepper, M. S., S. J. Mandriota, J. D. Vassalli, L. Orci and R. Montesano (1996) Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol*. **213 ( Pt 2)**, 31-67.
- Perez-Gomez, E., N. Eleno, J. M. Lopez-Novoa, J. R. Ramirez, B. Velasco, M. Letarte, C. Bernabeu and M. Quintanilla (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*. **24**, 4450-61.
- Prud'homme, G. J. (2007) Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*. **87**, 1077-91.
- Ray, R. M., R. J. Vaidya and L. R. Johnson (2007) MEK/ERK regulates adherens junctions and migration through Rac1. *Cell Motil Cytoskeleton*. **64**, 143-56.
- Robledo, M. M., A. Hidalgo, P. Lastres, A. G. Arroyo, C. Bernabeu, F. Sanchez-Madrid and J. Teixido (1996) Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol*. **93**, 507-14.
- Rodriguez-Barbero, A., J. Obreo, P. Alvarez-Munoz, A. Pandiella, C. Bernabeu and J. M. Lopez-Novoa (2006) Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem*. **18**, 135-42.
- Rodriguez-Barbero, A., J. Obreo, N. Eleno, A. Rodriguez-Pena, A. Duwel, M. Jerkic, A. Sanchez-Rodriguez, C. Bernabeu and J. M. Lopez-Novoa (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun*. **282**, 142-7.
- Sanchez-Elsner, T., L. M. Botella, B. Velasco, C. Langa and C. Bernabeu (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. **277**, 43799-808.
- Scharpfenecker, M., M. van Dinther, Z. Liu, R. L. van Bezooijen, Q. Zhao, L. Pukac, C. W. Lowik and P. ten Dijke (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. **120**, 964-72.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **103**, 211-25.
- Schnaper, H. W., T. Hayashida, S. C. Hubchak and A. C. Poncelet (2003) TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. **284**, F243-52.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. **9**, 726-35.
- Seton-Rogers, S. E., Y. Lu, L. M. Hines, M. Koundinya, J. LaBaer, S. K. Muthuswamy and J. S. Brugge (2004) Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 1257-62.
- Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto and S. Ghosh (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*. **19**, 2668-81.
- Shovlin, C. L. and M. Letarte (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax*. **54**, 714-29.

- Siegel, P. M., W. Shu, R. D. Cardiff, W. J. Muller and J. Massague (2003) Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 8430-5.
- St-Jacques, S., M. Forte, S. J. Lye and M. Letarte (1994) Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod.* **51**, 405-13.
- ten Dijke, P. and C. S. Hill (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* **29**, 265-73.
- Uneda, S., H. Toi, T. Tsujie, M. Tsujie, N. Harada, H. Tsai and B. K. Seon (2009) Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. *Int J Cancer.* **125**, 1446-53.
- Velasco, S., P. Alvarez-Munoz, M. Pericacho, P. T. Dijke, C. Bernabeu, J. M. Lopez-Novoa and A. Rodriguez-Barbero (2008) L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci.* **121**, 913-9.
- Walker, R. A., S. J. Dearing and B. Gallacher (1994) Relationship of transforming growth factor beta 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer.* **69**, 1160-5.
- Wang, A., S. Rana and S. A. Karumanchi (2009) Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda).* **24**, 147-58.
- Yue, J. and K. M. Mulder (2001) Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* **91**, 1-34.
- Zhang, H., A. R. Shaw, A. Mak and M. Letarte (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol.* **156**, 564-73.
- Zhang, Y. E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128-39.
- Zhu, H. J. and A. W. Burgess (2001) Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun.* **4**, 321-30.