

Artigos Originais

Evidências para Vasculogénese em Neoplasias da Próstata

Trabalho efectuado com o apoio da bolsa de investigação Abbott

Manuel Ferreira Coelho³, Miguel Lourenço³, Margarida Courinha¹, Cátia Igreja¹, Teresa Pereira², José Cabeçadas², Sérgio Dias¹

1 - Laboratório de Angiogénese, CIPM / Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil / Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Lisbon, Portugal

2 - Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil / Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Lisbon, Portugal

3 - Serviço de Urologia, Hospital Fernando Fonseca, Director: Dr. Carrasquinho Gomes, Amadora-Sintra, Portugal

Resumo

Objectivos: Dada a importância da angiogénese na progressão tumoral, bem como na origem celular de vasos neoformados, a partir de células pré-existentes ou de células progenitoras indiferenciadas, propomos: definir a presença e eventual importância de células progenitoras endoteliais (CPE), na génese ou progressão do carcinoma da próstata; identificar marcadores celulares e bioquímicos envolvidos neste processo e avaliar o seu eventual interesse clínico (ex: marcadores de prognóstico, resposta ou resistência terapêutica).

Doentes e Métodos: Procedeu-se à recolha de biópsias prostáticas de 49 doentes com diferentes diagnósticos (adenocarcinoma, prostatite, atrofia glandular e sem neoplasia). As amostras prostáticas foram analisadas para a presença de marcadores específicos de CPEs – AC133, KDR e c-Kit, por RT-PCR e FACS. Mediram-se também os níveis de VEGF (vascular endothelial growth factor) produzido pelas células prostáticas por ELISA (Oncogene Research Products) e correlacionaram-se estes valores com os diagnósticos clínicos e com os valores de PSA. Para testar o potencial de diferenciação das CPE incorporadas no tecido prostático, efectuaram-se ensaios de diferenciação endotelial *in vitro* com células obtidas das biópsias. Por imunohistoquímica efectuou-se a marcação para o VEGF em cortes de biópsias incluídas em parafina e determinou-se a densidade vascular para cada secção de tecido. A identificação da localização e do tipo de células que expressam o marcador AC133 foi efectuada por imunofluorescência em cortes de biópsias congeladas.

Resultados: 47% das biópsias prostáticas analisadas sugeriram presença de CPEs. Dois dos doentes com diagnóstico menos indicativo de malignidade, mas com PSA alto, apresentam CPEs com potencial de diferenciação *in vitro*, correlacionando-se com os níveis elevados de VEGF produzido por células do tecido prostático. As células positivas para o marcador AC133 encontram-se distribuídas pelo tecido, tanto junto a vasos, como no epitélio das glândulas prostáticas.

Conclusão: Detectaram-se CPEs em biópsias prostáticas e em 13% dos casos, têm potencial de diferenciação endotelial. A quantificação da incorporação e da capacidade de

Correspondência:

Manuel Ferreira Coelho,

MD

Tel.: (351) 213 955 701

E-mail: mxfoelho@clix.pt

diferenciação de CPEs poderá ser utilizada como factor predictivo de “turnover” tecidual, potencialmente um pré-requisito de malignidade.

Palavras-chave: Vasculogénese, CPE, AC I 33, Cancro da Próstata

Abstract

Background: The formation of new blood vessels (angiogenesis) is an essential step for the growth of malignant tumors and to their hematogenic spread. Endothelial progenitor cells (EPCs) have been reported to contribute to angiogenesis in adult organisms. In the current study, we investigated the presence, the localization, and the differentiation potential of detected and isolated in prostate tissue EPC in different prostate diseases.

Methods: Fresh tissues biopsies ($n = 52$) from patients with different prostate diseases were collected. Prostatic samples were used for RNA expression analysis of EPC specific markers (AC I 33, KDR, c-Kit). Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels produced by prostate cells of each sample were measured and correlated with the diagnostic and prostate specific antigen (PSA) value of each patient. Frozen tissue sections of prostatic biopsies were stained for AC I 33, CD31 and HMW Cytokeratins. To test the differentiation potential of prostate tissue derived EPC, cells were isolated from biopsies and used in endothelial differentiation assays.

Results: We detected the presence of prostate tissue EPC in 37% of biopsies from different prostate diseases. Prostatic biopsies with incorporated EPC presented the highest levels of VEGF. Prostatic AC I 33⁺ cells preferentially locate at the epithelial ducts but are also found isolated throughout the tissue. EPC isolated from biopsy samples were able to originate mature endothelial cells during endothelial differentiation assay.

Conclusions: EPC were detected in prostatic tissue and in 6% of cases they were able to differentiate into mature endothelial cells. Globally, EPC presence was more frequent in cases without neoplasia. The quantification and the differentiation potential of EPC may be used as additional markers of Prostate disease onset or progression. Anti-angiogenic therapies against EPC may have therapeutic potential for the treatment of this type of malignancy.

Métodos

Amostras

Foram recolhidas 49 biópsias prostáticas frescas de doentes com diferentes diagnósticos (adenocarcinoma, prostatite crónica, atrofia glandular e sem neoplasia).

As biópsias analisadas neste estudo incluíam: 7 casos de adenocarcinoma (gleason 6, 7 e 8), 14 casos de prostatite (crónica e ligeira), 4 casos de atrofia glandular e 17 casos sem neoplasia. Os níveis de antígeno específico da próstata (PSA) dos doentes variaram desde 0,84 a 18,8ng/ml.

Extracção de RNA e síntese de cDNA

Isolou-se RNA total de uma pequena fracção de cada biópsia e de células submetidas a ensaios de cultura celular utilizando o Trizol Reagent (Invitrogen), de acor-

do com as instruções do fabricante. Efectuou-se a transcrição reversa do RNA para cDNA com a enzima Superscript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) e os oligonucleótidos random primers (Roche Diagnostics corporation, USA).

RT-PCR

Efectuaram-se reacções de RT-PCR para os seguintes antígenos: BCR (controlo da síntese de cDNA), AC I 33, receptor 2 do VEGF (KDR), c-Kit, citoqueratina 5, citoqueratina 18, vimentina, receptor 1 do VEGF (Flt 1) e caderina (VE-cadherin) foram realizadas com os primers e as temperaturas de hibridização descritas na Tabela I.

Os produtos das reacções de PCR foram visualizados em géis de 2% agarose corados com brometo de etídio (Sigma).

Tabela I - Sequência dos oligonucleótidos utilizados nas reacções de RT-PCR e temperaturas de hibridação

	Sequência dos oligonucleótidos (5' -3')	Temperatura de hibridação
BCR forward primer	GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA	60°C
BCR reverse primer	CACAGTATCCTCAGGGTCTGGGA	
AC133 forward primer	GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACC	60°C
AC133 reverse primer	TCCTTGTAGACCCAGAAACT	
KDR forward primer	GTGACCAACATGGAGTCGTG	60°C
KDR reverse primer	CCAGAGATTCCATGCCACTT	
c-Kit forward primer	TGCTCCAATGTGTGGCA-GCAGG	65°C
c-Kit reverse primer	ACTCAGCCTGTTTCTGGGAAAC	
Citoqueratina 5 forward primer	CAACCCACTAGTGCCTGGT	59°C
Citoqueratina 5 reverse primer	ATAGCCACCCACT-CCACAA	
Citoqueratina 18 forward primer	GAGGTTGGAGCTGCTGAGA	58°C
Citoqueratina 18 reverse primer	GAGCTGCTCCATCTGTAGG	
Vimentina forward primer	TCTTGCGCTCCTGAA-AAAC	58°C
Vimentina reverse primer	GTCTTTGGCATGTGGCATT	
Flt-1 forward primer	CACCAAGAGCGACGTGTG	60°C
Flt-1 reverse primer	TTTTGGGTCTCTGTGCCAG	
Caderina forward primer	ACCGGATGACCAAGTACAGC	63°C
Caderina reverse primer	ACACACTTTGGGCTGGTAGG	

Análise das células AC133⁺ por citometria de fluxo (FACS)

A presença de células AC133⁺ nas biópsias prostáticas foi determinada por citometria de fluxo. Para tal, procedeu-se à dissecação e digestão enzimática de biópsias frescas com colagenase (Sigma), a uma concentração de 1 mg/ml, durante uma hora a 37°C. As células obtidas por este processo foram fixadas com Paraformaldeído (PFA) 1%, durante 5 minutos. De forma a determinar se as células da próstata AC133⁺ correspondem a CPEs ou a outro tipo de células indiferenciadas, efectuou-se a marcação das células com os seguintes anticorpos: AC133-PE (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), CD 45-APC (BD Biosciences, CA, USA), CAM 5.2 (BD Biosciences, CA, USA) e MNF 116 (DAKO Cytomation, Denmark). As marcações foram efectuadas segundo as instruções do fabricante de cada anticorpo. Efectuou-se ainda a marcação indirecta para o antígeno KDR. Para tal, incubaram-se as células com o anticorpo primário mouse anti-human KDR (ImClone Systems, NY, USA) durante 2 horas, à temperatura ambiente e com agitação. De seguida, incubaram-se as células com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com FITC (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Invitrogen), diluído 1:500, durante 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação.

As amostras foram analisadas utilizando o citómetro BD FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, CA, USA).

Marcação por imunofluorescência para o AC133

A localização e a identificação das células AC133⁺ foi determinada por imuno-fluorescência em secções de biópsias prostáticas congeladas, duplamente marcadas para AC133 e laminina. Cortaram-se secções de 4 mm de 2 biópsias num criostato e fixaram-se com acetona (Merck), durante 10 minutos. De seguida, deixaram-se secar durante 1 hora, à temperatura ambiente. Efectuou-se o bloqueio das secções de tecido com uma solução de tampão fosfato salino TBS 1X/ albumina de soro bovino (BSA, Sigma) 1% / FcR blocking reagent 5% (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo primário, mouse anti-human AC133/1 antibody (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), diluído 1:5, foi incubado durante a noite, a 4°C. De seguida, incubou-se com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com FITC, diluído 1:1000, durante 2 horas, a 4°C. Para a segunda marcação, bloquearam-se as secções de tecido com TBS 1X/BSA 1% / soro completo de cabra 5% (DAKO Cytomation, Denmark), durante uma hora, à temperatura ambiente e incubou-se com anticorpo primário rabbit anti human laminin (Sigma), diluído 1:100, durante a noite, a 4°C. O anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com Texas Red (Alexa Fluor 594, Molecular Probes, Invitrogen), diluído 1:500, foi incubado durante 2 horas, a 4°C. As secções de tecido foram examinadas utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss, Ger-

many), no canal de fluorescência para FITC e para Texas Red.

Quantificação da expressão de AC133

A quantificação da expressão de AC133 pelas células prostáticas foi efectuada por real-time PCR (RQ-PCR), a partir do cDNA das biópsias. Foram analisadas amostras de cDNA de 3 pacientes sem neoplasia, 4 pacientes com prostatite e 3 pacientes com adenocarcinoma. A quantificação foi efectuada no aparelho ABI Prism 7700HT Sequence Detection System com o kit SYBR Green Master Mix (ambos da Applied Biosystems, Foster City, CA). Os oligonucleótidos foram os mesmos utilizados para as reacções de RT-PCR para o AC133. Em cada ensaio, utilizou-se como controlo interno da reacção o gene BCR (housekeeping gene) e como calibrador cDNA da linha celular CACO. O programa da reacção consistia inicialmente numa desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A expressão relativa de AC133 foi calculada utilizando o método CT (comparative threshold cycle method).

Quantificação da expressão de VEGF

- ELISA

Pequenas fracções de cada biópsia prostática foram incubadas em duas placas de Petri (uma com revestimento de gelatina 1% e outra sem revestimento) e mantidas em meio RPMI (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após ter sido atingida a confluência celular, removeu-se o meio e as células foram mantidas 24 horas em meio RPMI sem soro. No final, removeu-se o sobrenadante e isolou-se RNA total das células, Segundo o protocolo descrito anteriormente. O nível de VEGF nos sobrenantes das culturas foi quantificado pela técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA, Oncogene Research Products, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A caracterização molecular das células presentes em cada placa foi realizada por RT-PCR.

- RQ-PCR

Para os casos em que não foi possível obter confluência celular os níveis de mRNA de VEGF foram quantificados por real-time PCR, a partir do cDNA das biópsias. As reacções de RQ-PCR foram efectuadas no aparelho ABI Prism 7700HT Sequence Detection System, com a sonda de VEGF (5'-6FAM-ACAGCACACAACAAATGTGAATGCAGACCAAA-TAMRA 3'), e os seguintes oligonucleótidos: forward primer 5'-CCAGCACATAGGAGA-GATGAGCTT-3' e reverse primer 5'-

CGCCTCGGCTTGTCACA-3'. Em cada ensaio, utilizou-se como controlo interno da reacção o gene ribossomal 18S (housekeeping gene) e como calibrador cDNA da linha celular HEL. O programa da reacção consistia inicialmente numa desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A expressão relativa de VEGF foi calculada utilizando o método CT.

De forma a definir os resultados da expressão de VEGF obtidos por ambos os processos (ELISA e RQ-PCR), a expressão do VEGF em cada amostra foi classificada como: (-) para unidades de expressão relativa de mRNA do VEGF inferiores a 0,5 ou para níveis de VEGF entre 0 e 150 pg/ml, (+) para unidades de expressão relativa de mRNA do VEGF entre 0,5 e 2 ou para níveis de VEGF entre 150 e 300 pg/ml, (++) para unidades de expressão relativa de mRNA do VEGF entre 2 e 4 ou para níveis de VEGF entre 300 e 450 pg/ml, (+++) para unidades de expressão relativa de mRNA do VEGF superiores a 4 ou para níveis de VEGF superiores a 450 pg/ml.

- Imunohistoquímica para o VEGF

Efectuou-se a marcação para o VEGF por imunohistoquímica em secções de biópsias da prostata incluídas em parafina. Sumariamente, foram cortadas secções de 2 mm de cada um dos blocos, desparafinaram-se e trataram-se com H₂O₂ a 0,6% em metanol para inibir a peroxidase endógena. De modo a aumentar a imunoreactividade do anticorpo efectuou-se a recuperação dos antigénios incubando 20 minutos no microondas. As secções de tecido foram bloqueadas com soro completo de cabra 10% (DAKO X907, Golstrup, Denmark), durante 10 minutos, á temperatura ambiente. Seguidamente, bloqueou-se a biotina e a streptavidina internas. Incubou-se com anticorpo primário, rabbit anti-human VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), diluído 1:500, durante a noite, a 4°C. A revelação foi alcançada após a incubação com o anticorpo secundário (biotin-conjugated secondary antibody), seguido de streptavidina-peroxidase e 3,3-diaminobenzidina (DAB; Dako K5001, Golstrup, Denmark). No final, efectuou-se a marcação das secções de tecido com hematoxilina de Mayer.

A marcação para o VEGF em cada secção de tecido prostático foi classificada como: (-) para ausência de marcação, (+) para uma marcação fraca, (++) para uma marcação moderada ou (+++) para uma marcação forte.

Determinação da densidade microvascular (DMV)

Determinou-se a densidade de vasos sanguíneos em cada uma das 11 biópsias prostáticas incluídas em para-

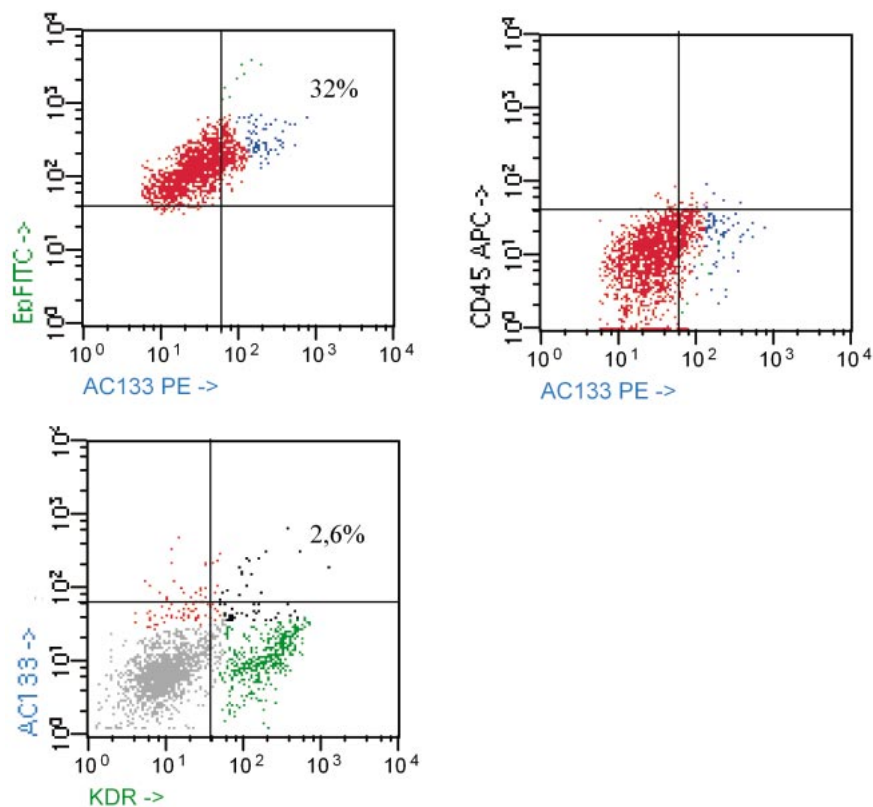


Figura 1. Análise do fenótipo das células AC133+ das biópsias prostáticas por FACS. De forma a identificar a linhagem da população AC133 presente nas biópsias prostáticas efectuou-se a marcação de células prostáticas para AC133, KDR, CD45 e para marcadores epiteliais (CAM 5.2 and MNF 116). Os números indicam a percentagem de células co-marcadas. Nesta análise foram incluídas biópsias de 2 casos de ADC, 1 caso de prostatite e 1 caso sem neoplasia.

fina. Dado o tamanho reduzido das biópsias, contabilizaram-se todos os vasos sanguíneos presentes nas secções de tecido marcadas com hematoxilina de Mayer. A DMV foi determinada com uma objectiva de 200x.

Ensaio de diferenciação endotelial

Testou-se o potencial de diferenciação das CPEs presentes nas biópsias prostáticas efectuando-se ensaios de diferenciação endotelial. Para tal, pequenas porções de biópsias prostáticas frescas foram dissecadas mecanicamente e digeridas com colagenase, segundo o protocolo descrito acima. As células prostáticas resultantes do processamento foram incubadas em placas de Petri, revestidas com gelatina 1% (Sigma), com meio específico para células endoteliais, EBM-2 (Clonetics), suplementado com 5% de soro fetal bovino e antibióticos. As células foram expandidas até 10 passagens. Em cada passagem, isolou-se RNA total, sintetizou-se cDNA e caracterizou-se molecularmente as células isoladas em cada passagem por RT-PCR, segundo os métodos descritos anteriormente.

Resultados e Conclusões

Presença de células AC133⁺ em biópsias prostáticas

A caracterização molecular, por RT-PCR, das biópsias prostáticas revelou a presença de células positivas para o AC133 em 59% (19/32) dos casos analisados (Tabela 1). Em 34% (11/32) das amostras detectaram-se células positivas para a expressão dos marcadores de CPE (AC133, KDR e c-Kit). Por esta técnica verificou-se ainda a presença em 94% das amostras de células epiteliais luminiais (citoqueratina 18 +), em 82% das amostras de células epiteliais basais (citoqueratina 5 +) e em 70% de amostras de células de estroma (vimentina +).

De forma a identificar a linhagem das células AC133+ efectuou-se a marcação para os antígenos AC133, KDR, CD45 e CAM 5.2/MNF 116, de células provenientes de 4 biópsias prostáticas. As biópsias estudadas incluíam: dois casos de ADC (gleason 6 e 7), um caso de prostatite e um caso sem neoplasia. A análise por citometria de flu-

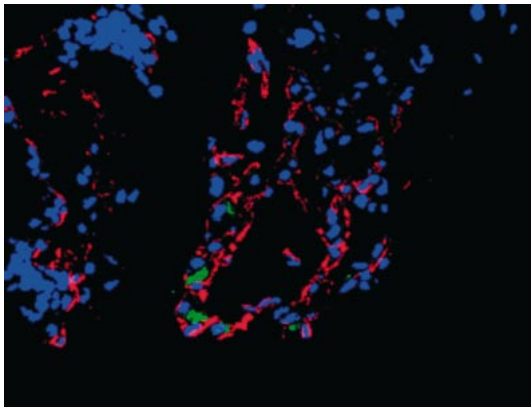


Figura 2. Marcação por imunofluorescência de secções de tecido prostático de um paciente com prostatite. Secção de 4 mm da biópsia congelada duplamente marcada com anti-AC133 (verde) e anti-laminina (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

o revelou a expressão de AC133 em 32% das células prostáticas (Figura 1). O estudo específica da população AC133+ permitiu concluir que 34% das células têm fenótipo epitelial e 2,6% co-expressam KDR. Relativamente à co-expressão de CD45 verificou-se não ser significativa.

A análise *in situ* da localização e da linhagem das células AC133+ foi efectuada em cortes de biópsias prostáticas, duplamente marcados para os antígenos AC133 e laminina (um componente da membrana basal). Foram analisadas biópsias prostáticas de um caso com prostatite crónica e outro sem neoplasia. Relativamente às secções de tecido do caso sem neoplasia não foram identificadas células positivas para a marcação AC133. A análise da marcação das secções de biópsia do caso de prostatite crónica permitiu identificar cerca de

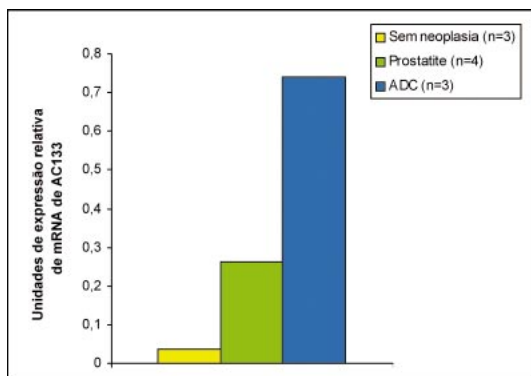
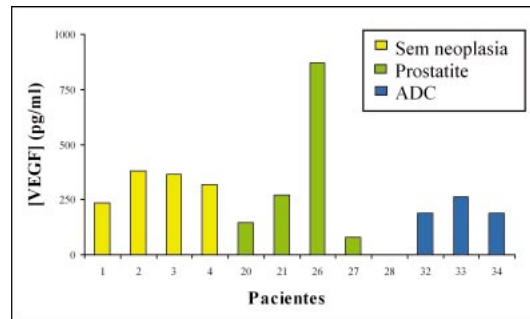
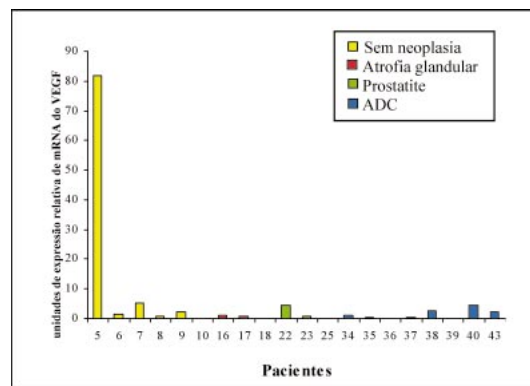


Figura 3. Quantificação dos níveis de mRNA de AC133 por real-time RT-PCR, a partir do cDNA de biópsias prostáticas. Foram incluídos 3 casos sem neoplasia, 4 de prostatite e 3 de ADC. Para cada diagnóstico clínico representou-se o valor médio obtido para o conjunto de amostras analisadas.

A



B



C



D

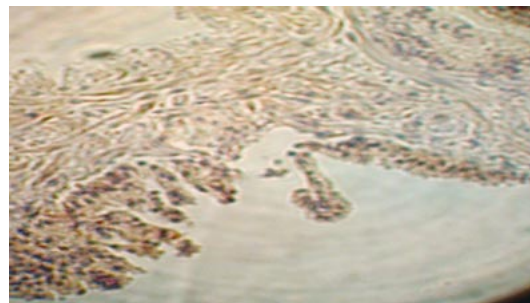


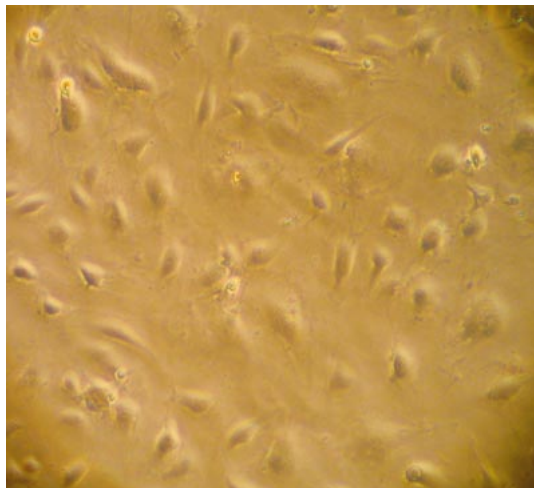
Figura 4. Análise da expressão de VEGF pelas células prostáticas. (A) Quantificação dos níveis de VEGF pela técnica de ELISA, a partir dos sobrenadantes das células prostáticas em cultura. (B) Quantificação dos níveis de mRNA de VEGF por real-time RT-PCR, a partir do cDNA das biópsias prostáticas. Marcação por imunohistoquímica para o VEGF em secções de biópsias prostáticas incluídas em parafina. (C) secção negativa para a marcação; (D) secção fortemente positiva para a marcação.

Tabela 2 - Correlação clínica e biológica para cada biópsia prostática

Paciente	AC133	Diagnóstico clínico	PSA (ng/ml)	VEGF	DMV
1	+	Sem neoplasia	6,60	+	
2	+	Sem neoplasia	10,00	+	
3	+	Sem neoplasia	10,00	+	
4	+	Sem neoplasia	12,48	+	
5	+	Sem neoplasia	11,00	+++	
6	-	Sem neoplasia	4,48	+	
7	-	Sem neoplasia	5,20	+++	
8	-	Sem neoplasia	4,00	-	
9	+	Sem neoplasia	5,46	++	
10	+	Sem neoplasia	4,40	-	
11	ND	Sem neoplasia	8,5	-	ND
12	ND	Sem neoplasia	8,09	+	ND
13	ND	Sem neoplasia	4,73	++	16
14	ND	Sem neoplasia	5,70	+	10
15	ND	Sem neoplasia	7,99	+++	77
16	+	Atrofia Glandular	4,20	-	
17	+	Atrofia Glandular	10,00	-	
18	-	Atrofia Glandular	10,38	-	
19	ND	Atrofia Glandular	4,56	-	15
20	-	Prostatite	8,05	-	
21	-	Prostatite	10,23	++	
22	+	Prostatite	11,90	+++	
23	+	Prostatite	3,98	-	
24	+	Prostatite	7,90	+	
25	-	Prostatite	5,04	-	
26	-	Prostatite	8,09	-	
27	+	Prostatite	12,40	+++	
28	+	Prostatite	16,30	-	
29	ND	Prostatite	0,84	-	13
30	ND	Prostatite	4,50	-	6
31	ND	Prostatite	14,35	++	57
32	+	ADC 6(3+3)	4,44	+	
33	+	ADC 7(3+4)	4,92	++	
34	-	ADC (4+3)	7,20	++	
35	-	ADC 6 (3+3)	11,42	-	
36	-	ADC 6(3+3)	4,68	-	
37	-	ADC 6(3+3)	9,60	-	
38	+	ADC 6(3+3)	18,80	++	
39	+	ADC 7 (3+4)	17,30	+++	
40	+	ADC 6 (3+3)	4,90	++	
41	ND	ADC 7 (3+4)	7,80	+++	140
42	ND	ADC 8 (4+4)	16,81	+	160
43	-	ADC 8 (4+4)	8,01	-	

Legenda: PSA – antígeno específico da próstata; VEGF – vascular endothelial growth factor; DMV- densidade microvascular; ND – não determinado; ADC - adenocarcinoma

A



B

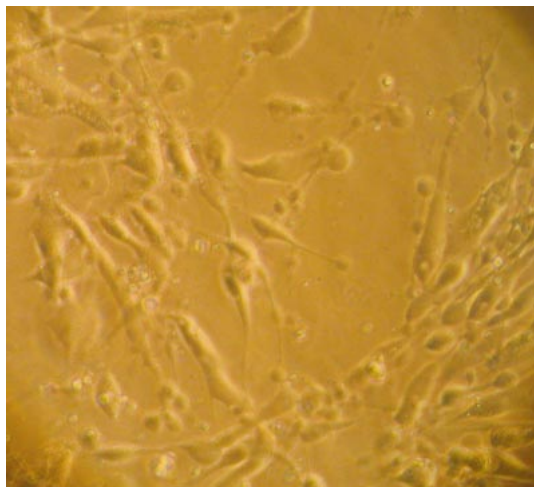


Figura 5. Ensaio de diferenciação endotelial. (A) Fotografia do ensaio de diferenciação endotelial do Paciente 5 na qual é visível a presença de células com morfologia típica de células endoteliais maduras. (B) Fotografia do ensaio de diferenciação endotelial do Paciente 4 na qual é visível a presença de células com morfologia semelhante à de fibroblastos.

1% de células AC133+ (Figura 2). Estas células localizam-se ao nível dos ductos e apresentam uma morfologia epitelial.

Correlação clínica e biológica

No estudo da expressão de AC133, realizado por RT-PCR, obtiveram-se diferenças significativas consoan-

te o diagnóstico clínico. A expressão deste marcador foi positiva em 17% (2/12) dos casos de ADC, 44% (4/9) dos casos de prostatite, 67% (2/3) dos casos de atrofia glandular e em 50% (5/10) dos casos sem neoplasia (Tabela 2).

No estudo por real-time RT-PCR para o AC133, também se verificaram padrões de expressão distintos para cada diagnóstico clínico (Figura 3). Para os casos sem neoplasia obteve-se uma média de 0,03 unidades de expressão relativa de mRNA de AC133, para os casos de prostatite o resultado foi de 0,26 e para os casos com ADC o valor foi de 0,74.

A expressão do factor pro-angiogénico VEGF foi analisada por ELISA nos sobrenadantes de culturas de células prostáticas, real-time RT-PCR de cDNA de biópsias e por imunohistoquímica em cortes de biópsias prostáticas. Na Figura 4 e Tabela 2 encontram-se reunidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas. Quando se compararam os níveis de expressão de VEGF com o diagnóstico clínico dos doentes não se verificou qualquer tipo de correlação. Relativamente à co-expressão de AC133 e VEGF, 73% (14/19) das biópsias AC133+ expressam VEGF, enquanto que apenas 30% (4/13) das biópsias AC133- expressam VEGF.

Potencial de diferenciação

Nos ensaios de diferenciação endotelial 20% (2/10) das células das biópsias prostáticas demonstraram potencial de diferenciação endotelial. A caracterização molecular, por RT-PCR, das células dos doentes 5 e 6 revelou a presença de células positivas para AC133, KDR e c-Kit. No final de 4 semanas em cultura, as culturas apresentavam células com morfologia típica de endoteliais maduras, que no final de 10 passagens não expressavam AC133 e eram positivas para KDR, Flt-1 e VE-cadherin, marcadores de células endoteliais maduras (Figura 4).

Referências

- (1) Peichev M, Nayier AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952-958.