**CAMILA MACHADO BALDAVIRA**

# Estudo do efeito da beta 2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**SÃO PAULO**
**2017**

**CAMILA MACHADO BALDAVIRA**

# Estudo do efeito da beta 2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**SÃO PAULO**
**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baldavira, Camila Machado
Estudo do efeito da beta 2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha / Camila Machado Baldavira. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Beta 2-glicoproteína I 2.Membrana corialantoide 3.Inibidores de angiogênese 4.Neovascularização fisiológica 6.Células endoteliais 7.Embrião de galinha

USP/FM/DBD-060/17

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família,*
*meu porto seguro e fonte inesgotável de amor.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvana e João Carlos, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, fossem estes bons ou ruins. São exemplos de vida, de caráter e que sempre me ensinaram sabiamente os caminhos corretos da vida.

Ao meu marido Pedro, que esteve junto comigo nesta empreitada desde o início, que sempre me motivou, me ajudou a ficar firme e, por que não, trabalhou e estudou comigo durante esse processo.

Ao meu irmão Felipe, e minha cunhada Luciana, que mesmo distantes fisicamente, mantiveram sempre seu apoio e incentivo.

A minha avó Heloisa, que sempre acreditou em mim e contribuiu com essa jornada.

Aos Baldaviras e Evangelistas, que me receberam tão bem em suas vidas e sempre acreditaram em meu trabalho.

Aos meus velhos e novos amigos, os quais prefiro não nomear para não cometer a injustiça de não citar alguém, que sempre acreditaram no meu potencial e enviaram palavras e gestos de carinho e incentivo.

As minhas amigas artistas, companheiras de hobby/terapia, que me ajudaram a ver que mesmo dias cinzas podem tornar-se lindos quando se tem pessoas incríveis por perto.

A Prof.ª Lígia Ferreira Gomes, uma pessoa muito querida e especial, com quem tive sorte de trabalhar, por toda compreensão, paciência, carinho, conhecimento e apoio em todos os momentos.

Ao Prof.º Durvanei Augusto Maria, que me deu uma grande oportunidade de aprendizado, e que mesmo em momentos difíceis, me compreendeu e acreditou em mim.

A todos os demais professores, alunos e funcionários que contribuíram com este trabalho de alguma forma, direta ou indiretamente.

*"Entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos".*

*(Alice no País das Maravilhas)*

# NORMAS

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Maria de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

**SUMÁRIO**

LISTAS DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1. Células endoteliais ..... 1
   1.1.1. Culturas celulares ..... 1
   1.2. Angiogênese ..... 2
   1.3. Determinação bioquímica da angiogênese ..... 5
   1.3.1. VEGF.. ..... 5
   1.3.2. Notch.. ..... 6
   1.3.3. Akt..... ..... 11
   1.4. Anexina 2 ..... 12
   1.5. $\beta_2$-glicoproteína I ..... 14
   1.6. Membrana Corioalantóide ..... 17
   1.7. Análise Computacional – Padrões Binários Locais ..... 18
2. OBJETIVO 20
3. MATERIAIS E MÉTODOS 21
   3.1. Obtenção da $\beta_2$GPI purificada ..... 21
   3.2. Eletroforese SDS-PAGE 12,5% ..... 21
   3.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA) ..... 21
   3.4. Cultura de células HUVEC ..... 22
   3.5. Crescimento Celular – Cultura Tridimensional (3D) ..... 23
   3.6. Padronização da coloração do fundo das imagens das culturas celulares..... ..... 23
   3.7. Ensaio *in vivo* de Angiogênese ..... 244
   3.8. Análise Computacional ..... 24
4. RESULTADOS 25
   4.1. Caracterização da $\beta_2$GPI purificada ..... 25
   4.3. Efeito *in vivo* de $\beta_2$GPI sobre a angiogênese ..... 28
   4.4. Análise matemática da CAM através de descritor LBP ..... 38

5. DISCUSSÃO 43
6. CONCLUSÃO 52
7. REFERÊNCIAS 53
8. ANEXOS 70
8.1. Anexo A – Imagens originais das culturas 3D ..... 70
8.2. Anexo B – Tabela de controle de umidade e temperatura medido pelo módulo Arduino ..... 71
8.3. Anexo C – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa ..... 73

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| 3D | Tridimencional |
| Akt | Proteína quinase B ou PKB |
| ANK | Repetições do tipo ankyrin |
| Anx-2 | Anexina 2 |
| apoH | Apolipoproteína H |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CAM | Membrana Corioalantóide |
| CBF1 | do inglês, "*C-Promoter Biding Factor 1*" (Fator de Transcrição CSL) |
| CCP | do inglês, "*Complement Control Proteins*" (Proteínas Reguladoras do Complemento) |
| CL | Cardiolipina |
| CSL | Proteína RBP-$J_k$ |
| c$\beta_2$GPI | Forma clivada da $\beta_2$-glicoproteína I |
| DSL | Proteínas Delta-Like e Jagged |
| EGF-Like | Domínios Tipo Fator de Crescimento Epidérmico |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| eNOS | Óxido Nítrico-Sintase Endotelial |
| EOMA | do inglês. "*Mouse Hemangioendothelioma Cell*" (Célula de Hemangioendotelioma Murino) |
| ERK | Quinases Reguladas por Sinal Extracelular |
| HAEC | Célula Endotelial Aórtica Humana |
| HD | Domínio de Heterodimerização |
| HUVEC | Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana |
| ICN | Porção Intracelular do Receptor Notch |
| JNK | Proteína Quinase c-Jun N-terminal |
| LNR | Repetições LIN-12/NOTCH |
| LPB | Padrões Binários Locais |
| MAPK | Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos |
| mTOR | Alvo da rapamicina em mamíferos |
| NEC | Porção extracelular do receptor Notch |

| | |
|---|---|
| NF-κB | Fator nuclear-κB |
| NRP-1 | Neuropilina-1 |
| NSL | Sítio de localização nuclear |
| NTM | Unidade transmembrana intracelular do receptor Notch |
| OPD | O-Phenylenediamine–dihydrochloride |
| PEST | Domínio [prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T)] |
| PI3K | Fosfoinositol-3-quinase |
| PIGF | Fator de crescimento de placenta |
| PKB | Proteína Quinase B ou Akt |
| PS | Fosfaditilserina |
| PTEN | Fosfatase homóloga a tensina |
| SCR | do inglês, “Short Consensus Repeat” (Repetições Consensuais Curtas) |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| sVEGF-R1 | Isoforma solúvel do receptor VEGF-R1 |
| TAD | Domínio de transativação |
| TRL | Toll-like Receptors |
| VEGF | do inglês, “*Vascular* E*ndothelial Growth Factor”* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) |
| VEGF-R | Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| $\beta_2$GPI | $\beta_2$-glicoproteína I |

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático da iniciação do broto vascular, ramificação e maturação do vaso.. ..... 3

Figura 2. Organização estrutural dos domínios do receptor Notch1 ..... 8

Figura 3. Via de sinalização Notch1 ..... 9

Figura 4. Representação esquemática da via de sinalização de VEGF-Dll4-Notch durante a angiogênese. ..... 11

Figura 5. Modelo molecular do domínio V da $\beta_2$GPI ..... 14

Figura 6. Representação estrutural da $\beta_2$GPI..... 15

Figura 7. Exemplo de cálculo de um código LBP ..... 19

Figura 8. Gel de SDS-PAGE 12,5%, corado por prata..... 25

Figura 9. ELISA direto para caracterização de $\beta_2$GPI purificada..... 26

Figura 10. Efeito de $\beta_2$GPI sobre a proliferação e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em baixa confluência ..... 27

Figura 11. Efeito de $\beta_2$GPI sobre a proliferação e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em semi-confluência. ..... 28

Figura 12. Aspecto macroscópico da membrana corioalantóide (CAM) *in vivo* após tratamento com $\beta_2$GPI, no 6º dia de incubação, 2º dia após a exposição 31

Figura 13. Aspecto macroscópico dos embriões após tratamento com $\beta_2$GPI, no 6º dia de incubação, 2º dia após a exposição ..... 32

Figura 14. Aspecto macroscópico da membrana corioalantóide (CAM) *in vivo* e dos embriões após tratamento com monômero de $\beta_2$GPI, no 10º dia de incubação, 6º dia após a exposição ..... 33

Figura 15. Imagens da membrana corioalontóica de ovos controles após 10 dias de incubação ..... 34

Figura 16. Imagens da membrana corioalontóica de ovos tratados com a fração monomérica da $\beta_2$GPI após 10 dias de incubação..... 35

Figura 17. Imagens da membrana corioalontóica de ovos controle após 6 dias de incubação. ..... 36

Figura 18. Imagens da membrana corioalontóica de ovos tratados com a fração monomérica da proteína após 6 dias de incubação ..... 37

Figura 19. Exemplo da análise realizada em uma das imagens obtidas da CAM do grupo controle após 6 dias de incubação ..... 38

Figura 20. Exemplo da análise realizada em uma das imagens obtidas da CAM do grupo submetido ao monômero de $\beta_2$GPI após 6 dias de incubação..... 39

Figura 21. Box Plot da análise das imagens das texturas da CAM nos ensaios de 6 dias, para r=1 ..... 41

Figura 22. Box Plot da análise das imagens das texturas da CAM nos ensaios de 10 dias, para r=1 ..... 42

Figura 23. Imagem original - Efeito de $\beta_2$GPI sobre o crescimento e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em baixa confluência ..... 70

Figura 24. Imagem original - Efeito de $\beta_2$GPI sobre o crescimento e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em semi confluência ..... 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanhos e pesos dos embriões analisados após 6 dias de incubação ..... 30

Tabela 2. Tamanhos e pesos dos embriões analisados após 10 dias de incubação ..... 30

Tabela 3. Exemplo de dados de controle de temperatura e umidade do interior da chocadeira ..... 71

**RESUMO**

Baldavira CM. Estudo do efeito da beta 2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Angiogênese é a formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, mediada por eventos de sinalização bioquímica que determinam proliferação, migração, diferenciação e morte celular e controlam crescimento e remodelação tecidual. A $\beta_2$-glicoproteína I ($\beta_2$GPI) é uma proteína plasmática com ação sobre a função vascular e a aterogênese. Monomêros de $\beta_2$GPI apresentam efeito anti-inflamatório e anticoagulante; a clivagem enzimática favorece sua dimerização e induz o aparecimento de efeitos opostos. Resultados anteriores mostraram que monômeros e dímeros de $\beta_2$GPI têm efeitos diferentes sobre a proliferação e a diferenciação de células endoteliais em culturas bidimensionais utilizadas como modelo de angiogênese. Os monômeros e dímeros de $\beta_2$GPI foram obtidos por purificação fracionada e caracterizada por SDS-PAGE e ELISA, como descrito. Neste trabalho, foram utilizadas culturas tridimensionais de células humanas vasculares de cordão umbilical (HUVEC) sobre Matrigel foram utilizadas para identificar efeitos de monômeros e dímeros da $\beta_2$GPI sobre a proliferação, migração e formação de estruturas de interação celular *in vitro.* O monômero de $\beta_2$GPI atuou como um fator de diferenciação endotelial dependente da densidade de plaqueamento, induzindo nas culturas tridimensionais de HUVECs a formação de fenótipos alongados, prolongamentos e estruturas de interação célula-célula. A fração dimérica modulou negativamente a proliferação de HUVECs. A membrana corioalantóide (CAM) de embriões de galinha foi empregada para estudar efeitos da $\beta_2$GPI sobre a angiogênese. *In ovo*, o dímero de $\beta_2$GPI impediu a angiogênese e induziu a morte embrionária 48h após a exposição, enquanto o monômero permitiu o desenvolvimento do embrião até o 10º dia, apesar de induzir mudanças precoces no desenvolvimento dos vasos da membrana corioalantóide. As estruturas da microvasculatura foram analisadas através de uma abordagem morfológica quantitativa, baseada na classificação de padrões binários locais (LBP). Alvos moleculares de $\beta_2$GPI relatados anteriormente

foram considerados como fonte dos efeitos observados *in vitro* e *in ovo*. Os resultados obtidos suportam dados anteriores sobre a inibição da via de sinalização de anexina-2/Akt pela $\beta_2$GPI. Adicionalmente, sugere-se a via de sinalização Notch como um alvo do efeito antiangiogênico de da $\beta_2$GPI.

**Descritores**: Beta 2-glicoproteína I, Membrana Corioalantóica, Inibidores de Angiogênese, Neovascularização Fisiológica, Células Endoteliais, Embrião de Galinha.

## ABSTRACT

Baldavira CM. Studying the effect of beta 2-glycoprotein I on the development of the vascular network of chorioallantoic membrane of chicken embryos [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Angiogenesis is the formation of new capillaries from pre-existing vessels, mediated by biochemical signaling events that determine proliferation, migration, differentiation and cell death, and control of tissue growth and remodeling. $\beta_2$-glycoprotein I ($\beta_2$GPI) is a plasma protein active on vascular function and atherogenesis. $\beta_2$GPI monomers present anti-inflammatory and anticoagulant effects. Enzymatic cleavage favors $\beta_2$GPI dimerization and induces the appearance of opposing effects. Previous results have shown that $\beta_2$GPI monomers and dimers induce different effects upon the proliferation and differentiation of endothelial cells in two-dimensional cultures used as an angiogenesis model. $\beta_2$GPI monomers and dimers were obtained by fractioned purification and characterized by SDS-PAGE and ELISA, as described. In this work, three-dimensional Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) cultures on Matrigel were used to investigate the effects of $\beta_2$GPI monomers and dimers upon proliferation, migration and *in vitro* formation of cellular interaction structures. The $\beta_2$GPI monomer performed as a density-dependent endothelial differentiation factor, inducing the formation of elongated phenotypes, membrane extensions and cell-cell interaction structures in three-dimensional HUVEC cultures; the dimeric fraction negatively modulated the proliferation and differentiation of HUVECs. The chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos was employed to study the effects of $\beta_2$GPI upon angiogenesis. *In ovo*, the $\beta_2$GPI dimer prevented angiogenesis and induced embryonic death after 48h exposure, while the monomer allowed embryo development up to the 10th day, despite it induced early changes in the development of chorioallantoic membrane vessels. Microvasculature structures were evaluated through a quantitative morphology approach, based on local binary pattern classification. Previously reported molecular $\beta_2$GPI targets were then considered as the source of the observed effects *in vitro* and *in ovo*. The obtained results support previous data on the inhibition of the annexin-2/Akt signaling pathway by $\beta_2$GPI. Additionally, the Notch signaling pathway is suggested as a target of the antiangiogenic effect of $\beta_2$GPI.



**Descriptors:** $\beta_2$-glycoprotein I, Chorioallantoic Membrane, Angiogenesis Inhibitors, Neovascularization Physiologic, Endothelial Cells, Chick Embryo.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Células endoteliais

As células endoteliais formam o endotélio vascular, que pode ser classificado como um tecido de revestimento pavimentoso simples, cujas células são geralmente achatadas e dispostas em monocamada, e que recobre a face interna dos vasos sanguíneos e o coração.

O endotélio vascular, embora estruturalmente simples, é funcionalmente complexo, apresenta muitas propriedades sintéticas e metabólicas que regulam a homeostase, como a regulação da trombose e de trombólise, a adesão de plaquetas, a modulação do tônus vascular e o fluxo sanguíneo, a regulação de respostas imunes e inflamatórias, e a angiogênese. Alterações de estrutura e função endotelial podem resultar em estados patológicos (Sumpio et al., 2002; Bahia et al., 2004).

As células endoteliais não apenas revestem os vasos, como mantém sua capacidade de divisão celular e movimento, sendo possível reparar e renovar o revestimento destes vasos em indivíduos adultos (Alberts et al., 2004). Além disso, estas células também podem formar novos vasos sanguíneos.

### 1.1.1. Culturas celulares

Os sistemas de cultura celular in vitro têm avançado rapidamente nas últimas décadas, sendo tais avanços associados aos métodos de cultura e suplementos utilizados. O uso de culturas tridimensionais (3D) representou um avanço significativo quanto aos ensaios atuais, visto que tal modelo apresenta características mais próximas às condições complexas (Vinci et al., 2012).

Enquanto o sistema bidimensional contribui para compreender a fisiologia celular e sobre como as células funcionam e respondem a estímulos, as culturas 3D permitem observar condições mais próximas às *in vivo*, com redução da janela entre a cultura celular e a fisiologia das células (Cukierman et al., 2001).

Algumas das áreas para as quais a aplicação de cultura 3D tem-se apresentado extremamente úteis incluem estudos de fármacos, ensaios de citotoxicidade, crescimento celular, apoptose, sobrevivência, expressão de genes e proteínas, diferenciação e alteração de desenvolvimento, bem como estudos sobre interações celulares em sistemas de co-culturas 3D (Ravi et al., 2015).

### 1.2. Angiogênese

A angiogênese, ou neovascularização, é a formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes no organismo e, é essencial para vários processos fisiológicos e patológicos de crescimento (Hanahan e Folkman, 1996; Carmeliet e Jain, 2000; Carmeliet, 2005). Este processo é necessário para a sobrevivência de tumores e metástases, pois todo crescimento tecidual depende de um fornecimento sanguíneo adequado (Auerbach et al., 1991; Marme, 2002; Carmeliet, 2005; Silva et al., 2005). E para que este ocorra de forma eficiente, existe a necessidade de interação adequada entre a migração das células endoteliais e a matriz extracelular circundante.

Durante a neovascularização fisiológica os vasos recém-formados rapidamente amadurecem e tornam-se estáveis, cessando sua proliferação. Quando o crescimento dos vasos sanguíneos assume condições patológicas, há perda do equilíbrio entre reguladores positivos e negativos, fazendo com que o crescimento dos vasos não seja interrompido e estes permaneçam em constante reconstrução, gerando um sistema vascular aberrante (Bergers e Song, 2005).

A hipóxia do tecido local é um fator chave para a angiogênese, pois ativa a produção celular local de fatores de crescimento pró-angiogênicos, tais como VEGF (do inglês, "*vascular endothelial growth factor*") e citocinas. As células endoteliais inativas dos vasos tornam-se (re)ativadas através do sinal de VEGF e inicia-se o processo de angiogênese. O início do processo requer células que rompam a parede do vaso, degradem a membrana basal, mudem sua forma celular, proliferem e coletivamente invadam o tecido circundante, estando ainda conectadas à rede vascular (Figura 1) (Blanco e Gerhardt, 2013).

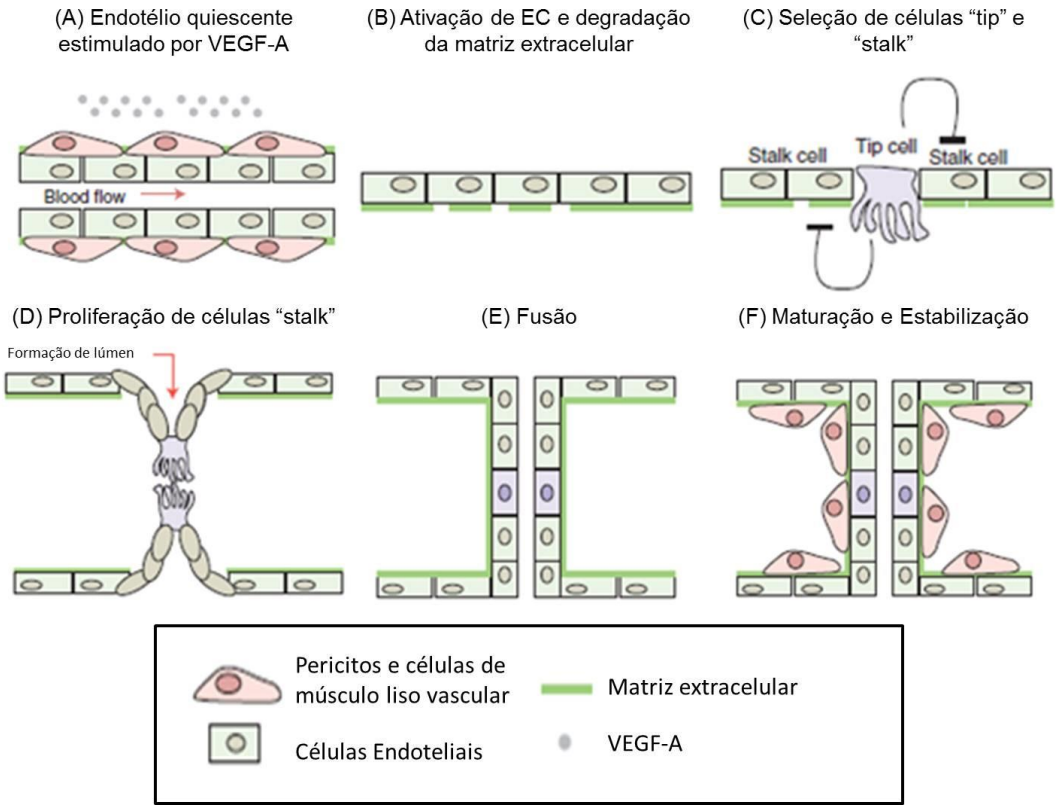


**Figura 1.** Modelo esquemático da iniciação do broto vascular, ramificação e maturação do vaso. A angiogênese é ativada em resposta a hipóxia do tecido local. (A) O VEGF-A lançado pelo tecido hipóxico (re)ativa as células endoteliais quiescentes (EC). (B) O início do processo requer a degradação da matriz extracelular, (C) além da especificação de (re)ativação ECs em células "tip" e "stalk". (D) ECs proliferam e invadem o tecido hipóxico coletivamente, enquanto permanecem ligadas à rede vascular inicial. No broto vascular nascente, as células "tip" caracterizadas por seu comportamento migratório e seu filopódia dinâmico levam o broto para a fonte de VEGF-A, a medida que as células "stalk" proliferam para apoiar o alongamento do broto; as células "tip" conectam os novos brotos em uma rede funcional. (E) A nova conexão entre diferentes brotos ocorre por meio de fusão das células "tip"; a formação do lúmen vascular inicia o fluxo sanguíneo, aumenta a oxigenação no tecido, e assim, reduz-se a liberação de fatores de crescimento endoteliais, reestabelecendo a quiescência. (F) A maturação e a estabilização do vaso prosseguem com o recrutamento de células suporte e a deposição de matriz extracelular. **Fonte:** Blanco e Gerhardt, 2013 - traduzido.

Durante a formação do broto vascular, as células endoteliais individuais adotam fenótipos e funções especializadas para coordenar e integrar um comportamento coletivo de cooperatividade e interdependência, descrito na literatura como um "trabalho em equipe" (Phng e Gerhardt, 2009). As principais vias para a modulação destes fenótipos são a via de sinalização do VEGF e do Notch.

As células endoteliais que determinam a direção de crescimento dos brotos vasculares são chamadas células endoteliais “tip”. Elas caracterizam-se por sua posição terminal no broto, seus filopódios longos e dinâmicos (ricos em actina), e por seu comportamento migratório. Os filopódios são estruturas importantes para que a célula possa sondar a matriz extracelular permitindo uma resposta rápida às alterações do microambiente (Phng et al., 2009). Análogo ao crescimento axonal, a rota para o crescimento do broto vascular é definida por estas células que interagem com sinais direcionais atrativos e repulsivos apresentados pelo ambiente e migram, orientando o conjunto (Gerhard et al., 2003). Além disto, as células “tip” são necessárias para criar ligações entre brotos diferentes, gerando uma rede interligada e funcional (Isogai et al., 2003).

Associadas às células “tip” na estrutura em formação, as células endoteliais “stalk” da extremidade do broto endotelial são altamente proliferativas e estabelecem junções aderentes e apertadas para garantir a estabilidade e formar o lúmen vascular nascente (Gerhardt et al., 2003; Dejana et al., 2009; Iruela-Arispe e Davis, 2009; Phng e Gerhardt, 2009).

Além de diferenciarem-se quanto à morfologia, as células endoteliais exibem perfis distintos de expressão gênica. O perfil transcricional das células “tip” inclui genes que codificam receptores de superfície celular, fatores de crescimento, receptores de orientação neuronais, proteases que degradam matriz, componentes da matriz, entre outros (Gerhardt et al., 2003; Claxton e Fruttiger 2004; Lu et al., 2004; Tammela et al., 2008).

As relações hierárquicas não simétricas entre as células endoteliais são dinâmicas e a diferenciação de células “tip” é reversível. Células “tip” e “stalk” competem continuamente para expressar o fenótipo “tip” e são controladas individualmente por níveis diferenciais de expressão de VEGF-R (Jakobsson et al., 2010). Caso uma célula “tip” migre erroneamente para uma região com níveis mais baixos de VEGF-A, ela pode perder a sensibilidade a este ligante e também sua vantagem competitiva sobre as demais células (Jakobsson et al., 2010). O fenótipo celular “tip” é definido pela sobrevivência e adaptação local e tem comportamento dominante sobre os demais, controlando o destino celular das células endoteliais adjacentes.

Existe ainda, um terceiro fenótipo de células endoteliais, as chamadas “phalanx” que, assim como as “stalk”, apresentam junções aderentes e compõem a camada celular intermediaria entre o vaso de origem e o broto vascular do novo vaso sanguíneo (De Bock et al., 2009). Estas células correspondem ao estado quiescente das células endoteliais e estão associadas a células de suporte (células de músculo liso vascular ou pericitos, dependendo do leito vascular) (Siemerink et al., 2012).

### 1.3. Determinação bioquímica da angiogênese

#### 1.3.1. VEGF

A via de sinalização do VEGF é essencial para a angiogênese tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, pois controla vários aspectos do comportamento endotelial, tais como: diferenciação, migração, proliferação, sobrevivência e controle de permeabilidade (Ferrara et al., 2003).

Em mamíferos, a família do VEGF compreende as glicoproteínas diméricas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento de placenta (PIGF) (Witmer et al., 2003), que exibem diferentes afinidades com os três receptores de VEGF (-R1, -R2 e -R3). Tais receptores são expressos em diferentes células e tecidos, sendo –R1 e –R2 mais expressos em células mielóides e neurônios (Barleon et al., 1996; Bellon et al., 2010; Muramatsu et al., 2010). Em adultos, o –R3 limita-se ao endotélio linfático, contudo, as células ativadas do endotélio sanguíneo do embrião, no pós-parto e durante a angiogênese de tumores, expressam –R3 e são reguladas por sinalização através desse receptor (Tammela et al., 2008).

O VEGF-A é o ligante mais predominantemente envolvido no processo angiogênico, sua expressão é induzida em condições hipóxicas, por citocinas, fatores de crescimento, hormônios, oncogenes e genes supressores de tumor (Dvorak, 2005), sendo o VEGF-R2 o principal receptor responsável por mediar os efeitos angiogênicos deste ligante (Takahashi e Shibuya, 2005; Olsson et al., 2006). A expressão relativa de –R2, crucial na diferenciação das células endoteliais, é maior em células “tip” do que nos outros fenótipos das células endoteliais (Gerhardt et al., 2003). Além disso, as células “tip” e seus filopódios expressam -R3 (Witmer et al., 2001; Siekmann e Lawson 2007; Tammela et al.,

2008, Benedito et al., 2009; Tammela et al., 2011). A ativação do receptor -R3 é feita pelo seu ligante VEGF-C e também é associada à sinalização pró-angiogênica, como ativadora do –R2 (Benedito et al. 2009; Galvagni et al., 2010; Zhang et al., 2010; Tammela et al., 2011).

O receptor -R1 é expresso em células “tip”, “stalk” e “phalanx”, e atua como “isca” (devido sua baixa atividade quinase) limitando a atividade da via do VEGF nas células endoteliais vasculares pela inibição competitiva da ligação de VEGF em –R2. Além disto, o splicing alternativo de -R1 produz uma isoforma solúvel deste receptor (sVEGF-R1) que sequestra o VEGF no meio extracelular e, consequentemente, compete com a sinalização de VEGF no endotélio (Tanaka et al., 1997). A ativação e a regulação de diferentes vias de sinalização controlam a migração, a sobrevivência, a proliferação e a formação de tubo das células endoteliais (Blanco e Gerhardt, 2013).

Existem relatos de que homozigotos silenciosos para o gene VEGF-A ou qualquer gene VEGF-R envolvidos na via de sinalização de VEGF conduzem a morte do embrião de ratos, em consequência do desenvolvimento anormal da rede vascular, no período E8,5 e E10,5 do desenvolvimento intrauterino (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Dumont et al., 1998). Também há relatos de letalidade embrionária associada à supressão heterozigótica do VEGF-A no período E11 e E12 (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Ainda, o VEGF-A e Delta-like 4 (Dll4) (via ligação Notch) são as únicas proteínas de ambas as vias para as quais um fenótipo heterozigoto causa letalidade do embrião, dado papel essencial e único destas proteínas durante o processo de angiogênese.

### 1.3.2. Notch

A via de sinalização Notch é uma via de sinalização altamente conservada entre diferentes espécies, que atua sobre o desenvolvimento de diferentes células em processos fisiológicos, dependente da comunicação direta entre estas células para regular a proliferação, sobrevivência, diferenciação e apoptose em diferentes tecidos (Bray, 2006; Rocha, 2009).

A família Notch é subdividida em quatro genes: *Notch1, Notch2, Notch3* e *Notch4*, que são transcritos em proteínas que atuam como receptores transmembranas, com diferentes funções para cada um deles. Estes receptores são expressos em diferentes tipos de células e atuam na diferenciação, escolha e especificação de destino, e proliferação celular. A ativação destes receptores é normalmente induzida pela associação a ligantes expressos por células vizinhas, são eles: Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 e Jagged-2 (Garcia e Kandel, 2012; Aste-Amézaga et al., 2010).

O gene Notch1 é o mais amplamente estudado, cujo locus gênico está na região 9q34.3 e seu transcrito gera uma proteína de 2555 aminoácidos com mais de 300kDa (Kovall, 2007; Kopan e Ilagan, 2009). Mesmo sendo traduzida em uma única cadeia peptídica, esta proteína Notch1 é clivada em seu sítio S1 antes de ser transportada para a membrana, assumindo caracter de receptor heterodimérico (Kopan e Ilagan, 2009).

Estruturalmente, o receptor Notch pode ser dividido em 3 componentes: seu componente extracelular, responsável pela interação com os ligantes; o domínio transmembrana, responsável pela ativação do receptor; e o domínio de sinalização intracelular, que irá interagir com o material genético. A ligação entre o receptor Notch e o ligante ativa a via de sinalização Notch nesta célula e a supressão da atividade das células vizinhas por um mecanismo de inibição lateral (Garcia e Kandel, 2012).

A porção extracelular do receptor Notch (NEC) é composta por uma série de domínios tipo fator de crescimento epidérmico (“EGF-Like”) que contêm diversos sítios de glicosilação e fucosilação, estes domínios EGF são responsáveis pelas interações com o ligante, seguido por três repetições LIN-12/NOTCH (LNR), que mantêm o receptor em conformação resistente a proteases na ausência de ligantes. A unidade transmembrana intracelular (NTM) permanece associada a NEC, em repouso, através do domínio de heterodimerização (HD). HD e LNR formam um bloqueio molecular importante para a prevenção da ativação espontânea do receptor Notch, na ausência da interação ligante-receptor. A porção intracelular (ICN) contém um domínio RAM associado ao CBF1 (do inglês, “c-promoter biding factor 1”; fator de transcrição CSL) importante para a ativação da via de sinalização, seguido por repetições do tipo ankyrin (ANK), o domínio de transativação (TAD), e o

domínio PEST [prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T)] – que limita a intensidade e a duração da ativação de Notch (Figura 2) (Garcia e Kandel, 2012; Aste-Amézaga et al., 2010; Paganin e Ferrando, 2011).

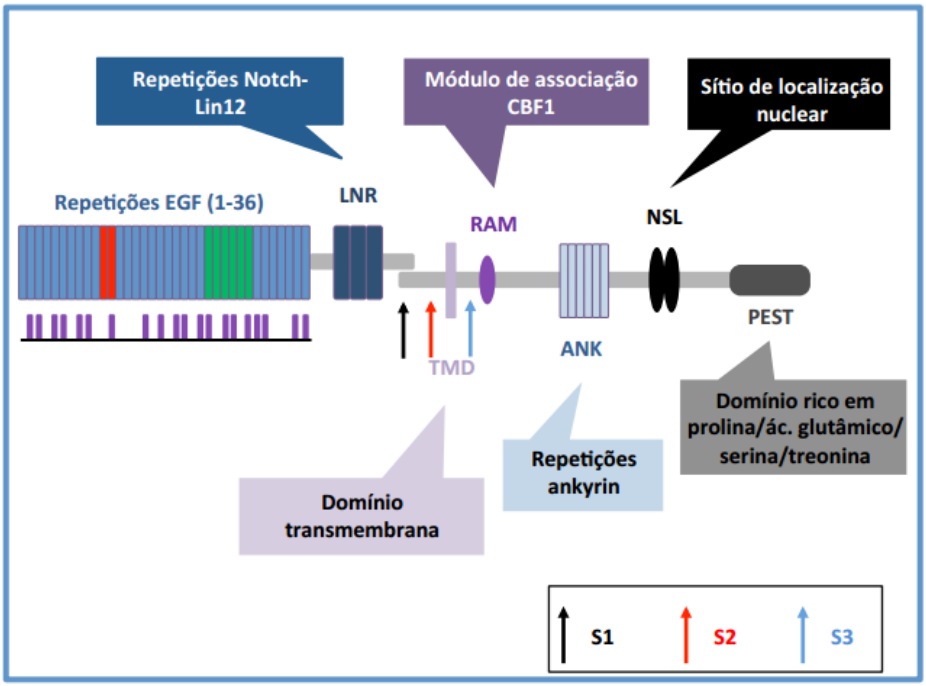


**Figura 2.** Organização estrutural dos domínios do receptor Notch1. A porção extracelular apresenta 36 repetições do tipo EGF e múltiplos sítios de glicosilação-fucosilação (representados na cor roxa); LNR: Repetições Notch-Lin12; TMD: domínio transmembrana; RAM: núcleo de associação a CBF1; ANK: repetições ankyrin; NSL: sítio de localização nuclear; e PEST: domínio rico em prolina/ácido glutâmico/serina/treonica; S1, S2 e S3 indicam os sítios de clivagem proteolíticas do receptor Notch1. **Fonte:** Yamashita, 2013.

Os ligantes de Notch são denominados de proteínas DSL, são elas: Delta-Like (Dll1, Dll3, Dll4) e Jagged (Jag1 e Jag2). Estes ligantes localizam-se na membrana plasmática das células e o contato célula-célula é importante para a ativação desta via de sinalização. Após interação com um ligante, o receptor Notch altera sua conformação estrutural, expondo o sitio de clivagem S2 na porção extracelular do receptor para clivagem proteolítica, via ação da metaloproteinase. A porção extracelular do receptor é então endocitada pela célula vizinha e direcionada para degradação proteica.

O receptor Notch sofre ainda uma segunda clivagem em seu sítio S3 na porção intracelular pelo complexo enzimático gama-secretase, que inclui as proteínas presinilin, niscatrin, Pen2 e APH1, liberando no citoplasma o domínio intracelular de Notch. No citoplasma, o domínio intracelular de Notch é translocado para o núcleo por meio da proteína adaptadora importina-α, e atua como fator de transcrição ligando-se ao seu co-ativador CSL (proteína RBP-Jk), ativando genes alvos, tal como *HES1, HERP1* e *HERP2*, sendo que recentemente foram descritos sítios de ligação para CBF1 no promotor de CCND1 (Figura 3) (Iso et al., 2003; Stahl et al., 2006; Huenniger et al., 2010).

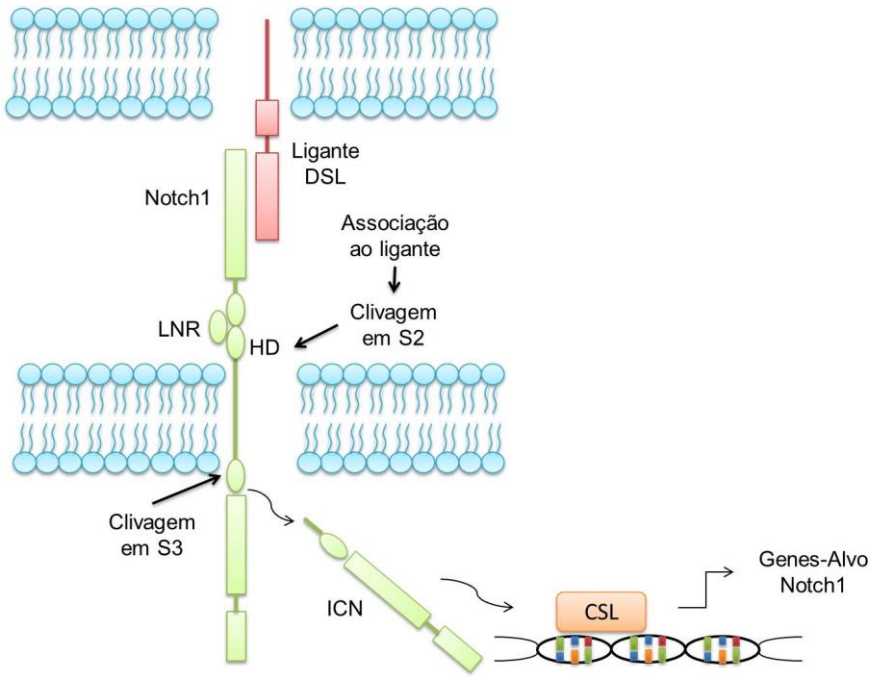


**Figura 3.** Via de sinalização Notch1. O receptor Notch1 interage com o ligante DSL (Delta-Like ou Jagger) e é ativado, sofrendo mudança conformacional em Lin12/Notch (LNR) e dissociação das subunidades do domínio de heterodimerização (HD). Em seguida ocorre a clivagem do receptor pela metaloprotease no sítio de clivagem S2 e consecutivamente ocorre nova clivagem no sítio S3 pelo complexo gama-secretase. Estas clivagens liberam o domínio intracelular (ICN) de Notch que interage com a molécula de DNA por meio da formação de um heterodímero com a proteína RBP-$J_k$ (CSL), ativando a transcrição dos genes alvo. Fonte: Organizada pelo autor

#### 1.3.2.1. Inibição lateral

O mecanismo de inibição lateral é o mais conhecido mecanismo de ação do Notch, pois parece ocorrer em diversos contextos celulares. No entanto, para que esta ação ocorra é necessário o contato célula-célula. Na célula em que há estimulo Notch, a via de sinalização funciona de modo inibitório: a produção de ligante é reduzida, e a do receptor, aumentada. Desta forma, implicam-se fenômenos de diferenciação distintos para células vizinhas (Kimble e Simpson, 1997).

O mecanismo de inibição lateral ocorre durante a diferenciação de células endoteliais para a formação de novos vasos. A diferenciação de células “tip” em uma população de células endoteliais quiescentes é bem regulada, uma vez que o excesso de células “tip” resulta em uma rede vascular hiperdensa que pode não ser funcional. Através desse mecanismo, as células “tip” regulam negativamente o fenótipo “tip” nas células adjacentes e o fenótipo proliferativo “stalk” se mantém (Siemerink et al., 2013). Esta sinalização é produzida pelo balanço entre as vias de sinalização VEGF/Notch.

Os níveis de expressão de VEGF-R2 e alguns outros receptores determinam se uma célula endotelial irá adquirir o fenótipo “tip” ou não. Para as células que foram induzidas ao fenótipo “tip” a sinalização de VEGF-R2 induz a expressão de Dll4 que é então transportado à membrana celular e liga-se ao receptor Notch da célula vizinha (Figura 4). Quando associado ao Dll4, o receptor Notch é clivado e dá origem ao domínio ICN, que atuará como regulador de transcrição e reduzirá a expressão de VEGF-R2, -R3, e neuropilina-1 (NRP-1) na célula adjacente que adota o fenótipo “stalk”, induz a transcrição de VEGF-R1 e de sua variante de splicing sVEGF-R1, solúvel (Siekmann e Lawson, 2007; Suchting et al., 2007; Harrington et al., 2008; Tammela et al., 2008). O sVEGF-R1 secretado pelas células “stalk” se liga ao VEGF-A presente na matriz extracelular, diminuindo seus níveis locais (Harrington et al., 2008), consequentemente, reduzindo a sinalização VEGF/VEGF-R2 nas células “stalk” consolidando, assim, este fenótipo.

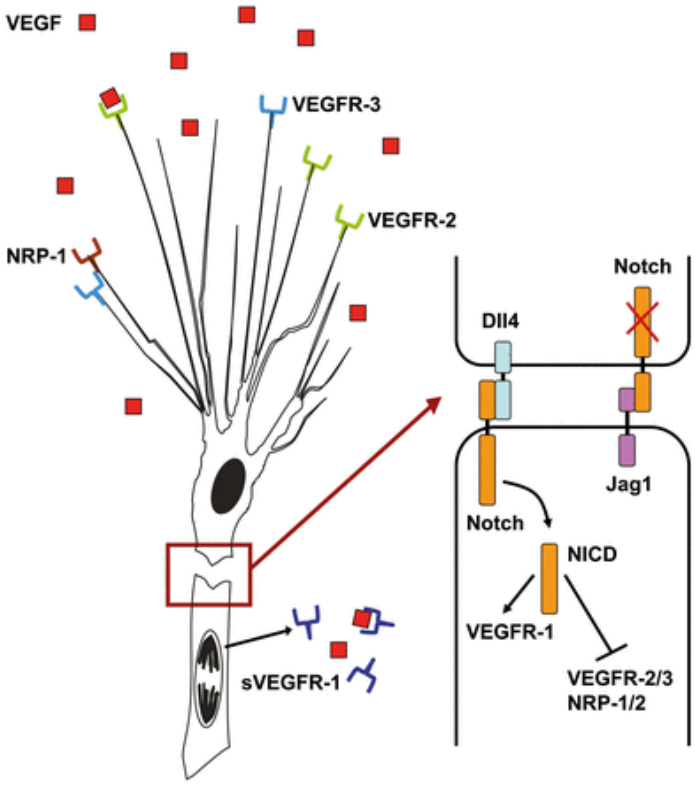


**Figura 4.** Representação esquemática da via de sinalização de VEGF-Dll4-Notch durante a angiogênese. Células "tip" expressam o receptor do fator de crescimento vascular endotelial 2 (VEGF-R2) e receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3 (VEGF-R3) em conjunto com vários co-receptores, incluindo a neuropilina-1 (NRP1), para detectar os sinais do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Gradientes extracelulares de VEGF atuam sobre a atração de células "tip". Após a ativação, as células "tip" expressam Dll4, que se liga a receptores Notch nas células "stalk" adjacentes. Em células "stalk", o receptor Notch é clivado por gama-secretase, libertando o domínio intracelular de Notch (NICD), que reduz a expressão de VEGF-R2 e VEGF-R3, e aumentando a expressão VEGF-R1. sVEGF-R1 é liberado pelas células "stalk" e se liga às moléculas de VEGF para bloquear a sinalização VEGF local. Jagged1 é expressa pelas células "stalk" e regula negativamente a atividade Notch em células "tip". **Fonte:** Siemerink et al., 2012.

### 1.3.3. Akt

A proteína quinase B (PKB), também conhecida por Akt, é uma serina/treonina-quinase, que desempenha um importante papel sobre a proliferação e a sobrevivência celular de diferentes tipos celulares. No entanto, esta quinase encontra-se inativa em células em repouso. A Akt é ativada por vários estímulos como hormônios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (Nicholson et al., 2002). A cascata de sinalização inicia-se com a ativação da Akt por fosfoinositol-3-quinase (PI3K), que sofre autofosforilação após ligação com fatores de crescimento (Orcy et al., 2008).

A via de sinalização da Akt é regulada por múltiplos mecanismos, e muitas vezes envolve interações cruzadas com outras vias de sinalização com NF-κB (fator nuclear-κB), proteínas da família Bcl-2, mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), entre outras. Caso ocorram problemas com a regulação desta via, pode acarretar em um aumento na atividade de sinalização e este desequilíbrio vem sendo associado a uma variedade de doenças, como câncer e diabetes tipo II.

Akt apresenta efeitos diretos na inativação de BAD (Datta et al., 1997), pode também recrutar Raf-1 para as mitocôndrias (Majewski et al., 1999), influenciar a expressão de proteínas envolvidas na permeabilidade mitocondrial (Nebigil et al., 2003) e participar da fosforilação da caspase-9 humana, inativando-a e reduzindo assim a sinalização de apoptose (Song et al, 2005).

A Akt apresenta efeitos funcionais sobre células endoteliais e tumorais e atua sobre a angiogênese fisiológica e patológica. Em células endoteliais, esta via de sinalização é ativada por VEGF e a fosforilação dos alvos de Akt coopera com a sobrevivência, crescimento e proliferação. Akt ativa a eNOS (óxido nítrico-sintase endotelial), que estimula a vasodilatação, remodelagem vascular e também a angiogênese (Orcy et al., 2008).

A via PI3K/Akt tem diferentes efeitos após sua ativação, exibindo fisiologicamente um estreito controle de regulação. A via é regulada negativamente por redução dos níveis de PI3K através de seu antagonista PTEN (Fosfatase homóloga a tensina), a perda desta molécula leva a sobre-ativação de Akt, efeito comum em células cancerosas (Georgescu, 2010).

### 1.4. Anexina 2

A anexina 2 (anx-2) é uma proteína de 36kDa que pertence a família de proteínas que se ligam a fosfolipídios e são dependentes de cálcio (Hajjar et al., 1996; Gerke e Moss, 2002; Rescher e Gerke, 2004). As anexinas são altamente conservadas na maioria dos organismos unicelulares e multicelulares e tal fato indica que tais proteínas possuem um papel essencial para a função celular (Gerke e Moss, 2002).

Esta proteína apresenta um domínio N-terminal, que possui um sítio de ligação a S100A10 (Gerke et al., 2005), um resíduo reativo de cisteína (Madureira et al., 2011) e uma sequência de exportação nuclear (Liu et al., 2003). Já seu domínio C-terminal possui sítios de ligação a fofolipídios, F-actina, fibrina e heparina (Filipenko e Waisman, 2001). Esta proteína existe na forma monomérica ou como heterotetramero (Gerke e Weber, 1985). A anx-2 pode ser encontrada na membrana plasmática, no citoplasma e, em pequena quantidade, no núcleo celular (Courtneidge et al., 1983; Eberhard et al., 2001; Hitchcock et al., 2014). Sua localização é determinada pela fosforilação desta proteína, que também afeta sua função nos diferentes tipos celulares em que é encontrada (Luo et al., 2008; de Graauw et al., 2008; Morel e Gruenberg, 2009).

Anx-2 foi descrita em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, trofoblastos, monócitos, macrófagos, células mesangiais e diferentes tipos de células tumorais (Hajjar et al., 1994; Kaczan-Bourgois et al., 1996; Hitchcock et al., 2014). Dentre as muitas funções da anx-2, a melhor descrita é sua interação com o ativador de plasminogênio tecidual e com o plasminogênio, convertendo-o em plasmina, regulando desta forma a fibrinólise (Hajjar et al., 1994; Waisman, 1995; Kassam et al., 1998; Hajjar e Krishnan, 1999). Além disso, facilita a remodelação do tecido, degrada a matriz extracelular e participa do processo de angiogênese (Jacovina et al., 2009; Sharma et al., 2010; Valapala et al., 2011). Segundo Su e colaboradores (2010), quando a anx-2 é estimulada por esfingosina 1 e fatores de crescimento angiogênicos, ela regula a ativação da via de sinalização Akt no processo de neovascularização.

A proteína anx-2 também está envolvida com o processo de inflamação, no qual interage com a $\beta_2$GPI, recrutando o receptor TLR-4 e ativando as vias NF-κB, PI3-quinase e a MAPK p38 (Swisher et al., 2007; Swisher et al., 2010; Li et al., 2007; Li et al., 2010).

No interior da célula, a anx-2 está envolvida com a regulação da dinâmica do citoesqueleto, os processos de endocitose e exocitose, a adesão célula-célula, a polaridade celular e a formação do endossoma (Rescher e Gerke, 2004; Yamada et al., 2005; Hayes et al., 2006; Morel et al., 2009; Hichcock et al., 2014). Já no interior do núcleo foi descrita por desempenhar o papel de proteção a danos no DNA durante o estresse oxidativo (Madureira et al., 2012).

### 1.5. $\beta_2$-glicoproteína I

A $\beta_2$-glicoproteína I ($\beta_2$GPI), também denominada como apolipoproteína H (apoH), é uma proteína plasmática inicialmente descrita no sangue humano em 1961 (Schultze et al., 1961). Apresenta uma cadeia polipeptídica de 326 aminoácidos organizados em cinco domínios de 60 aminoácidos e 11 pontes dissulfeto (Lozier et al., 1984; Steinkasserer et al., 1991).

A $\beta_2$GPI pertence à família das proteínas reguladoras do complemento (do inglês, "complement control proteins", CCP) ou de "repetições consensuais curtas" (do inglês, "short consensus repeat", SCR), (Ichinose et al., 1990).

Seu quinto domínio possui uma região rica em lisina (K282NKEKK287) com afinidade de ligação a superfícies carregadas negativamente, como heparina, DNA (Schousboe et al., 1988), fosfolípides negativos como fosfaditilserina (PS) e cardiolipina (CL) e lipídios oxidados em membranas biológicas (Brington e Chesterman, 1994; Goldsmith et al., 1994; Sanguera et al., 1997b; Averna et al., 2004 Sheng et al.,1996; Yasuda et al., 2000). Os resíduos de aminoácidos positivos presentes neste domínio (Lisinas, Arginina e Histidina), contribuem para o posicionamento da região hidrofóbica denominada *loop* flexível, composto pelos aminoácidos Ser$^{311}$-Ser-Leu-Ala-Phe-Trp-Lys$^{317}$, que se fixa na membrana fosfolipídica estabilizando a interação desta com a molécula de $\beta_2$GPI (Figura 5).

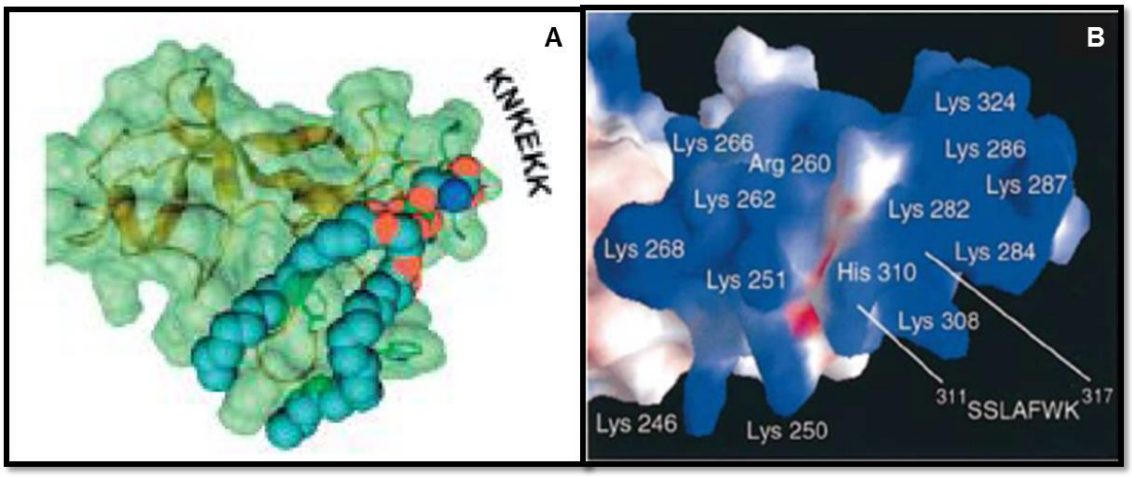


**Figura 5.** Modelo molecular do domínio V da $\beta_2$GPI. (A) Modelo molecular do domínio V da $\beta_2$GPI ligado a uma molécula de fosfatidilserina. Estão indicados os principais átomos carregados positivamente, parte rica em lisina (KNKEKK) (Hammel et al., 2001). (B) Potencial eletrostático de superfície do domínio V, positivamente carregado, e a organização dos resíduos de aminoácidos. Os 14 resíduos em destaque contribuem para o posicionamento da proteína sobre membranas fosfolipídicas, denominado *loop flexível*. **Fonte:** Bouma et al., 1999.

Em 1999, grupos publicaram resultados em que a estrutura cristalina da $\beta_2$GPI apresentava forma de J ou anzol (Figura 6) (Schwarzenbacher et al., 1999; Bouma et al., 1999).Estudos mais recentes têm proposto estruturas diferentes para a proteína, em 2002, Hammel e colaboradores através de experiências de dispersão de raios X de pequeno ângulo afirmaram que em solução a $\beta_2$GPI apresenta forma de S (Hammel et al., 2002). Recentemente foi descrita uma conformação da proteína nativa em conformação circular (Agar et al, 2010).

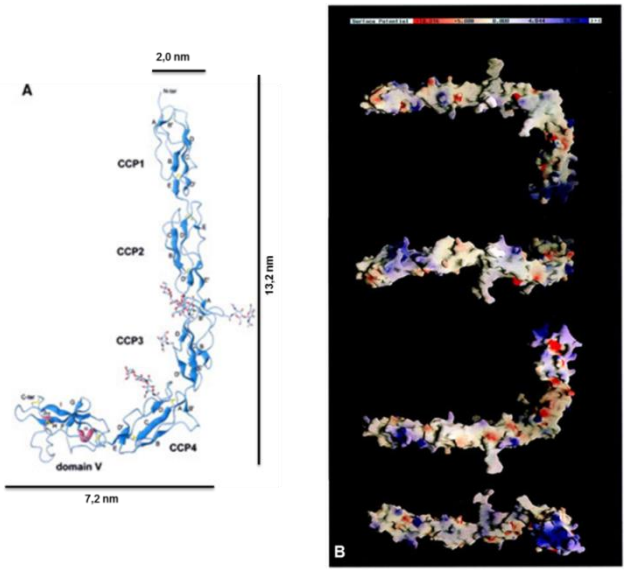


**Figura 6.** Representação estrutural da $\beta_2$GPI. (A) Representação estrutural da $\beta_2$GPI apresentando seus cinco domínios e suas dimensões. As conformações em folhas-β são representadas em azul e as α-hélices em vermelho. (B) Superfície molecular da $\beta_2$GPI, de acordo com seu potencial eletrostático. Carga positiva representada em azul, negativa em vermelho. **Fonte:** Schwarzenbacher et al., 1999.

A $\beta_2$GPI pode ser encontrada no plasma (Polz et al., 1980), na linfa (Borensztajn et al., 1985; Laplaud et al., 1991), no liquido cefalorraquidiano (Koch et al., 2001), no humor aquoso (Richardson et al., 2009), no fluido vítreo (Simó et al., 2008), na saliva (Ramachandran et al., 2008) e no fluido folicular (Aleporou-Marinou et al., 2001). No plasma, cerca de 60% da proteína total circula na forma livre e 40% associada a lipoproteínas, principalmente as ricas em triglicerídios, quilomícrons e VLDL, um pouco menos na HDL (Polz et al., 1980, Balasubramanian et al., 1997; Koch et al., 2001). Também pode ser encontrada no sangue circulante de várias outras espécies (Polz et al., 1980; De Groot et al., 2000, De Groot e Meijers, 2011).

Esta proteína tem por principal sítio de síntese o fígado, sendo reabsorvida nos rins ligada à megalina no túbulo proximal (Moestrup et al., 1998). No entanto, sua expressão (RNAm e proteína) vem sendo demostrada em outros tecidos e em diferentes linhagens celulares, como placenta, células endoteliais, linfócitos, monócitos, neurônios (Conti et al., 2003; Averna et al., 2004). Sua concentração plasmática em humanos é variável, cerca de 0,280 mg/mL, e possivelmente exercida por controle genético (Sanguera et al., 1997a; Mehdi et al., 1999), aumentando sua ocorrência devido a doenças inflamatórias e autoimunes (Arvieux et al., 1996; Brigton et al., 1996; Horbach et al., 1998; Balasubramanian et al., 1998; Biasiolo et al., 1999; Gomes et al., 2004). Sua ausência ou deficiência não está associada a alterações patológicas conhecidas (Yasuda et al., 2000).

O mecanismo de ação da $\beta_2$GPI ainda não foi completamente elucidado, mas a proteína tem sido associada a várias funções fisiológicas, como o metabolismo de triglicerídeos, a coagulação sanguínea, a homeostase e a fibrinólise (Yasuda et al., 2000; Takeuchi et al., 2000; Miyakis et al., 2004). Segundo Lin et al. (2001, 2005) a $\beta_2$GPI também apresenta potencial em inibir a apoptose, a oxidação de LDL e o acumulo de colesterol em células vasculares, sugerindo um papel importante na regulação da função vascular.

Recentemente, têm sido atribuídas propriedades anti-angiogênicas a $\beta_2$GPI, tanto *in vitro* como *in vivo* (Rakic et al., 2003; Beecken et al., 2006; Sakai et al., 2007; Yu et al., 2008; Nakagawa et al., 2009; Machado et al., 2013). *In vivo* a $\beta_2$GPI é capaz de se ligar ao endotélio através de moléculas de heparan sulfato expressas na membrana, além de fosfolipídios aniônicos, ApoER2, anexina II, TRL (*toll-like receptors*) 2 e 4 e proteoglicanas (Lutters et al., 2003; Ma et al., 2000; Pennings et al., 2006; Alard et al., 2010).

A ativação e a morte das células endoteliais foram atribuídas à associação *in vivo* com as formas dimérica e clivada da proteína, que são obtidas durante a purificação da proteína nativa (Stella e Gomes, 2013). Efeitos de pH foram igualmente associados a mudanças de conformação e associação da proteína *in vivo* e *in vitro*, fenômenos não completamente caracterizados estruturalmente, mas cuja fisiopatologia potencialmente se associa a mecanismos precoces de resposta tecidual a lesão (Stella e Gomes, 2013).

A heparina favorece a clivagem da $\beta_2$GPI em seu quinto domínio pela plasmina, produzindo uma forma clivada da cadeia da proteína, em que os fragmentos produzidos permanecem ligados por uma ponte dissulfeto (Hunt et al., 1993). Trombina, tPA, fator tecidual/fator VIIa e uroquinase não são capazes de clivar a $\beta_2$GPI. A clivagem pelo fator Xa é muito lenta (Hagihara et al., 1997) ou não observável (Horbach et al., 1998). A forma clivada da $\beta_2$GPI (c$\beta_2$GPI) é gerada *in vivo* em estados patológicos de fibrinólise aumentada e é incapaz de se ligar a fosfolipídeos (Horbach et al. 1998; Ohkura et al., 1998; Miyakis et al., 2004). Tanto a lesão quanto a ativação do endotélio levam a uma perda do caráter anticoagulante da proteína e o desenvolvimento de propriedades pró-inflamatórias e pró-coagulantes no entanto, a base molecular de sua conversão funcional ainda é desconhecida.

Além da clivagem enzimática, alguns mecanismos de degradação redox foram estudados (Arvieux et al., 2001; Buttari et al., 2005; Rahgozar, 2012). Associa-se a secreção de tiol-oxiredutases por células endoteliais e plaquetas à redução da $\beta_2$GPI (Passam et al., 2010a; Ioannou et al., 2010). Desta forma, é possível observar a participação da $\beta_2$GPI em processos redox associados à biologia vascular (Giannakopoulos et al., 2010; Passam et al., 2010a). Ioannou et al. (2010) relataram que a $\beta_2$GPI reduzida, através de tiorredoxinas e NADPH, aumentou a viabilidade das células endoteliais *in vitro*.

### 1.6. Membrana Corioalantóide

O ovo amniótico possui três membranas extraembrionárias: âmnio, córion, e alantoide, que circundam o embrião mediando às trocas entre ele e o ambiente e proporcionando um meio aquoso para o seu desenvolvimento dentro da casca do ovo.

A membrana alantoide se funde com o córion para criar a membrana corioalantóide (CAM), um processo dirigido pelo aumento rápido da vesícula alantóica que ocorre a partir do 4° até o 10° dia de incubação, promovendo a fusão destas estruturas (Ribatti et al., 2001). Esta membrana altamente vascularizada é crucial para o desenvolvimento do embrião, uma vez que é responsável pelo transporte de cálcio a partir da casca de ovo, além de funcionar para a troca

gasosa, equilíbrio ácido-base e reabsorção de eletrólitos a partir da cavidade alantoide, onde os produtos de resíduos urinários estão excretados.

Ao longo das décadas, o interesse da pesquisa sobre a CAM de embriões de galinha motivou trabalhos nas disciplinas de Embriologia, Morfologia, Bioquímica e Fisiologia em uma tentativa de relacionar as diferentes funções da CAM e identificar os componentes moleculares e os mecanismos pelos quais essas funções são realizadas (Narbaitz, 1995).

Da mesma forma, o ensaio da CAM também tem sido amplamente utilizado como método bem estabelecido para realização de estudos de angiogênese e anti-angiogênese por permitir observar modificação mensurável na densidade de vasos (aumento ou redução) 72-96 horas após a estimulação (Ribatti et al., 1995; Ribatti et al., 2001). A CAM também foi usada para estudar os passos envolvidos na formação da metástase em ensaios utilizando tumores sólidos ou suspensões de células cancerígenas de diferentes origens (Ribatti et al., 1996; Zijlstra, 2002) e para estudar o efeito de substâncias antineoplásicas e anti-angiogênicas na presença de células tumorais (Pereira-Lopes, 2009).

Ensaios de angiogênese com a CAM utilizam tanto a nomenclarura *in vivo* como *in ovo.*

### 1.7. Análise Computacional – Padrões Binários Locais

A técnica conhecida como “Padrões Binários Locais” (LPB) e consiste em classificar cada pixel na imagem segundo um critério de comparação que considera a relação de intensidades entre cada pixel e seus vizinhos (Ojala et al., 1996; Ojala et al., 2000).

O método de classificação dos pixels é baseado num cálculo que utiliza as características da própria imagem. Inicialmente para cada pixel da imagem, associa-se uma sequência binária de tamanho *P* que representa a diferença de intensidades entre um pixel *x* e seus *P* vizinhos, assim um valor de 0 na sequencia binária informa que a intensidade de um dos vizinhos de *x* é menor que a intensidade *x*. Considera-as também que os pixels vizinhos encontram-se distribuídos uniformemente ao redor de x a uma distância de *R* pixels.

Em seguida, a sequência de *P* valores binários é convertida para seu equivalente decimal. Este último valor contém informações sobre a relação de intensidades entre os pixels de sua vizinhança e também sobre as posições associadas aos valores maiores ou menores que foram comparados com o valor original de intensidade da imagem naquela posição (Figura 7).

A literatura que descreve os métodos de visão computacional revela que determinados arranjos e simetrias são muito mais frequentes do que outros nas imagens de um mesmo conjunto de amostras. Alguns são ainda mais gerais e servem a todo tipo de amostras e imagens. Por exemplo, são descritos padrões associados a bordas, cantos, vales, picos, etc.

Por isso, nesse tipo de análise, é possível produzir histogramas a partir de um número reduzido de classes que individualizam determinados valores (associados a padrões morfológicos de interesse ou mais comuns) e considerar de maneira agrupada os demais. Este recurso simplifica e abrevia muito o tempo de processamento de imagens complexas. O resultado final pode ser descrito em um histograma que irá descrever quantitativamente a textura presente na imagem analisada ou em uma nova imagem colorida que demonstra visualmente a distribuição. A distribuição espacial dos padrões permite, ainda, estudar a correspondência entre os padrões atribuídos e as estruturas de interesse na imagem original.

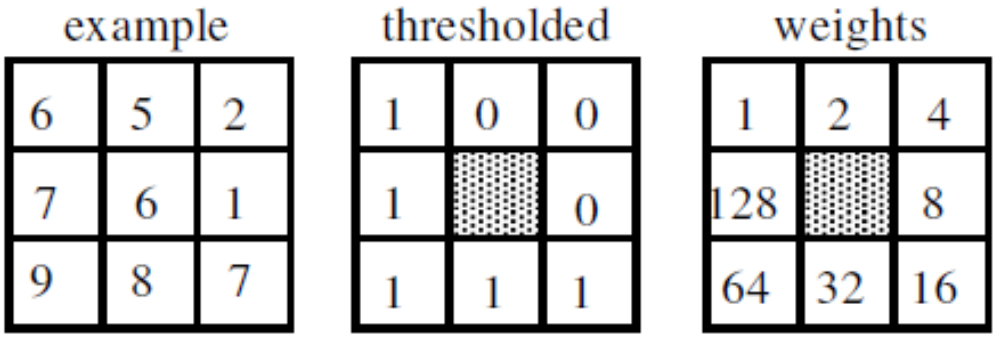


**Figura 7.** Exemplo de cálculo de um código LBP em uma análise de R=1, com conversão em números binários e sequencia numérica exponencial de base 2. Fonte: Machine Vision Group, [20--]

## 2. OBJETIVO

Descrever os efeitos das subfrações de purificação da $\beta_2$-glicoproteína I ($\beta_2$GPI) sobre células endoteliais em culturas tridimensionais *in vitro* e sobre a angiogênese no modelo da membrana corioalantóide (CAM) de embriões de galinha.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. Obtenção da $\beta_2$GPI purificada

A $\beta_2$GPI foi purificada a partir de plasma humano (Polz et al, 1980, modificado), por cromatografia de afinidade, após precipitação em ácido perclórico (2,5 mL/100 mL de plasma, adicionados gota a gota, durante 15 min e sob agitação). A mistura foi centrifugada a 11000 g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi colhido e neutralizado a pH 7,0 com carbonato de sódio saturado, seguido de diálise em tampão Tris 20mM/NaCl 30mM pH 7,0, por 24 h a 4°C. A amostra dialisada foi diluída 1:2 (volume:volume) em tampão Tris 20mM/NaCl 30mM pH 7,0 e passada pela coluna de Sepharose-Heparina (GE HealthCare 6 Fast-Flow), equilibrada com o mesmo tampão. Ligações inespecíficas foram eliminadas por lavagem com tampão Tris 20mM/NaCl 50mM pH 7,0. A $\beta_2$GPI purificada foi eluída com tampão Tris 20mM/NaCl 200mM pH 8,0. O perfil de eluição foi determinado pela absorbância das alíquotas em 280nm. A coluna foi então lavada com tampão Tris 20mM/NaCl 500mM pH 8,0. Todo o procedimento foi realizado a 4°C sob fluxo constante de 2mL/min.

## 3.2. Eletroforese SDS-PAGE 12,5%

A eletroforese foi realizada em um sistema Protean 3 (BioRad), com gel de SDS-PAGE (12,5%) por 80 min a 120 V e 2 A. Foram utilizados 5 µg de proteína por poço e 3 µL do padrão de peso molecular (Sigma, mw-sds-200), em duplicata. Os géis foram corados utilizando coloração de prata.

## 3.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio imunoenzimático foi realizado em placas NUNC MAXISORP (96 poços), próprio para este fim. A placa foi inicialmente sensibilizada durante uma noite com a solução de $\beta_2$GPI (0,25µg/poço) e tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,6. No controle negativo não foi colocada proteína no poço; em outro controle, não foi adicionado o anticorpo primário.

Após a sensibilização, os poços foram lavados com 250 µL/poço de tampão PBS Tween 0,05%, por cinco vezes em lavadora automática (Washwell ELISA Plate Washe), seguida por etapa de bloqueio de ligações inespecíficas com 200 µL/poço o PBS Tween 0,05%/ Leite 5%, durante 1h a 37°C. Após nova lavagem, os poços foram incubados com 100 µL de AcMo anti-$\beta_2$GPI humana (clone $K_2$2), durante uma hora à 37°C. Após posterior lavagem, os poços foram incubados com 100 µL de anticorpo secundário Anti-IgG Mouse (Fc específico), conjugado com peroxidase, por 1h a 37ºC.

Realizou-se nova lavagem e seguiu-se a etapa da revelação com solução reveladora (O-Phenylenediamine–dihydrochloride (OPD) 1mg/mL, água oxigenada 30% 0,84 µL/mL e água destilada). A placa adicionada com a solução de revelação permaneceu em câmara escura por cinco minutos até que a reação foi interrompida com o ácido sulfúrico. A leitura da placa foi realizada em comprimento de onda de 492nm em leitora automática de placas (TP-Reader NM Thermo Plate).

### 3.4. Cultura de células HUVEC

A linhagem de célula endotelial de veia umbilical humana (HUVEC), que foi utilizada para a verificação controle do processo de angiogênese e influência da proteína $\beta_2$GPI sobre este processo, foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC CRL-1730) (Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Invitrogen) com 10% soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), 100U/mL penicilina (Invitrogen) e 100µg/mL estreptomicina (Invitrogen) e mantidas em estufa com 5% de atmosfera de $C0_2$ a 37°C como descrito na literatura. A viabilidade das células foi avaliada através do método de exclusão de corante durante a contagem manual com Azul de Tripan.

### 3.5. Crescimento Celular – Cultura Tridimensional (3D)

Para esta etapa foi utilizada Matrigel®, uma membrana basal reconstituída composta por laminina, colágeno IV, entactina e nitrogênio (Kleinman et al., 1986) previamente descongelada à temperatura de 4ºC, para evitar sua gelificação prematura e diluída para uso em meio RPMI sem SFB.

Foram utilizados 20µl de Matrigel®, reunidos com as células em meio sem SFB, e com diluições das diferentes frações de purificação da proteína $\beta_2$GPI (0,2µM) previamente à gelificação. A mistura foi depositada no centro da placa de cultura seguida de sua incubação a 37ºC por 1 hora para gelificação, posteriormente foi adicionado meio de cultura sem SFB nas culturas. Seu desenvolvimento foi fotodocumentado em intervalos de 24 horas.

Os ensaios celulares foram preparados em duas densidades diferentes, com $5x10^3$ células/poço, para condição de baixa confluência inicial, e com $1x10^5$ células/poço, para condição de semi-confluência.

### 3.6. Padronização da coloração do fundo das imagens das culturas celulares

As fotomicrografias das culturas realizadas foram obtidas a partir da câmera AxioCam ERc5s acoplada ao microscópio Carl-Zeiss AX-10 através do software de captura Zen Lite 2011, utilizando aumento de 20x. Visando padronizar a coloração do fundo das imagens obtidas, estas foram tratadas utilizando o software Adobe Photoshop CS4 versão 11.0x20071101. Foram aplicados os filtros de cor, luminosidade e contraste para destacar a cultura de células, reduzindo ruídos e sombras produzidos por reflexos na lente do microscópio. As imagens foram normalizadas para o melhor ajuste de brilho e contraste com cores em escala de cinza. As imagens originais estão disponíveis no Anexo A.

### 3.7. Ensaio *in vivo* de Angiogênese

O efeito das diferentes frações da proteína $\beta_2$GPI sobre o processo de angiogênese *in vivo* foi avaliado através utilização do modelo da membrana córioalantóica (CAM) de embriões de galinha em ovos embrionados. Os ovos foram incubados como descrito por Ribatti et al. (1996) com o auxílio de uma chocadeira (Zagas – São Paulo/SP; alocada no Instituto de Física - USP) a 51% de umidade interna e 37ºC (a estabilidade destes parâmetros foram acompanhados utilizando módulo de Arduino desenvolvido em colaboração pelo Prof. Dr. Adriano M. Alencar, do Instituto de Física – USP; exemplo apresentado no item 8.2. Anexo B – Tabela de controle de umidade e temperatura).

Os ovos foram expostos à $\beta_2$GPI através de injeção cuidadosa e lenta das diferentes subfrações de purificação da proteína na albumina, em volumes reduzidos (2,5µg/mL), no 4º dia de incubação. A viabilidade dos embriões durante a incubação foi acompanhada diariamente através de ovoscopia até o 10º dia de incubação, quando foi interrompida a incubação para a coleta do material. A inviabilidade do embrião foi utilizada como critério de interrupção do ensaio; neste caso o material foi colhido assim que constatada a perda de viabilidade e documentada a morfologia do embrião. A coleta dos embriões viáveis ocorreu após a hipotermia do embrião como descrito anteriormente (Pereira-Lopes, 2009).

As medidas do peso e das dimensões dos embriões foram obtidas e depois os embriões foram fixados e processados para análise futura. As membranas foram fixadas rapidamente em formaldeído tamponado diluído e analisadas úmidas. Depois foram desidratadas e secas ao ar para arquivo do material.

### 3.8. Análise Computacional

As imagens capturadas da CAM foram analisadas utilizando técnicas de visão computacional que permitiram obter informação quantitativa sobre a textura da imagem. A implementação da técnica de LPB bem como o processamento das imagens foram determinados através de um software escrito na linguagem Matlab R2013, desenvolvido em parceria com o Mestre Leandro Ticlia De La Cruz, do Instituto de Matemática da Universidade de São Paulo.

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Caracterização da $\beta_2$GPI purificada

Após o processo de purificação e mensuração da densidade óptica de cada uma das frações coletadas, estas amostras foram analisadas quanto à migração eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5%, corado por prata, para observação da presença das bandas principais, correspondentes às frações monoméricas e diméricas da proteína, isoladas ou em conjunto, como ilustra a Figura 8. Outras ocorrências como a presença de agregados maiores e fragmentos foram consideradas como critério de exclusão para os testes *in vitro* e *in vivo*. Para uso, consideramos a fração 6 contendo o dímero e um concentrado de frações contendo somente o monômero como a fração 13 deste lote de purificação.

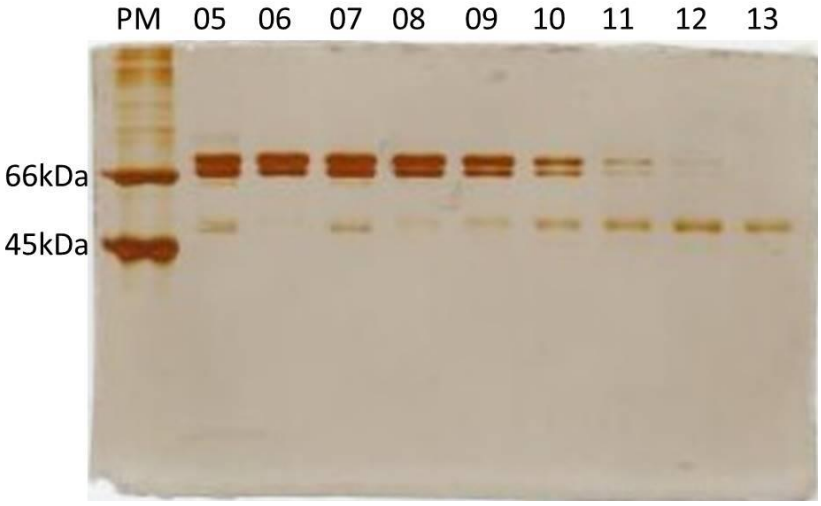


**Figura 8**. Gel de SDS-PAGE 12,5%, corado por prata, representando algumas das alíquotas de eluição obtidas em Tampão Tris 20mM NaCl 200mM pH 8,0 durante a purificação da $\beta_2$GPI.

A caracterização da proteína através de ensaio ELISA direto, utilizando anticorpo monoclonal clone $K_2$2, está apresentada na Figura 9. Este ensaio permitiu selecionar as frações para utilização em ensaios posteriores.

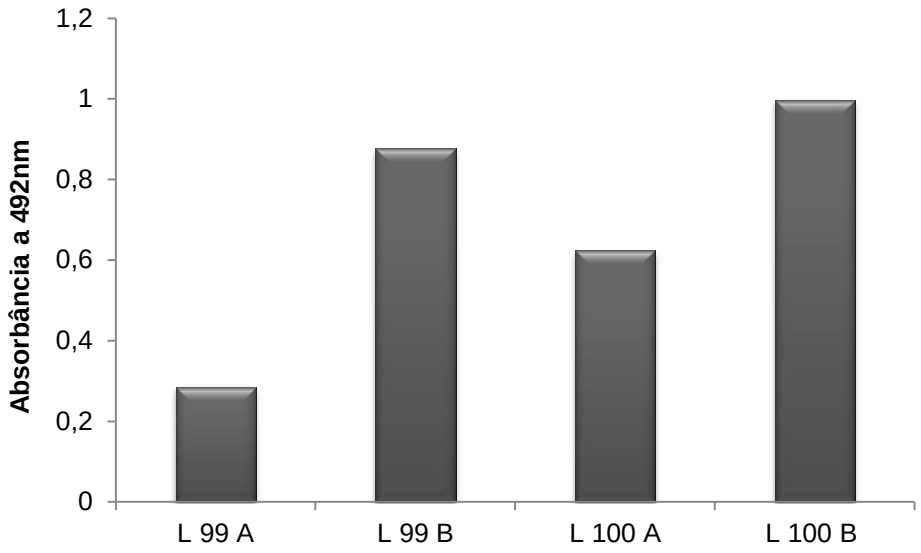


**Figura 9.** ELISA direto para caracterização de $\beta_2$GPI purificada, em diferentes lotes de purificação. As frações A representam a fração dimérica da proteína, e as frações B, a porção monomérica. Placa adsorvida com a concentração de 0,25µg/poço. Anticorpo primário monoclonal anti- $\beta_2$GPI clone $K_2$2 (1:250). Anticorpo secundário anti-IgG conjudado à peroxidase (1:2000). Reação revelada com OPD 1mg/mL e $H_2O_2$, bloqueada com $H_2SO_4$ 4N. Leitura em $\lambda$=492 nm.

## 4.2. Efeito in vitro de $\beta_2$GPI sobre a proliferação e morfologia celular de HUVECs em cultura tridimensional

O efeito da exposição das HUVECs à $\beta_2$GPI em culturas 3D *in vitro* mostrou-se dependente da densidade de plaqueamento.

Nas HUVECs com baixa confluência inicial, correspondendo ao inóculo de $5x10^3$ células/poço, a exposição a 2µg $\beta_2$GPI incluída no substrato de Matrigel® não modificou a morfologia celular, embora tenha atrasado o início da proliferação. O dímero mostrou um efeito maior do que o monômero, que foi quase indistinguível dos controles. Imagens do desenvolvimento celular das culturas em baixa confluência, durante 96h de cultivo, foram obtidas a cada 24h e estão mostradas na Figura 10. A frequência de células grandes, arredondadas ou com prolongamentos radiais parece ser maior nos controles do que nas amostras, havendo diferenças nas proporções entre fenótipos “tip” e “stalk”.

Quando o ensaio foi realizado com o inóculo de $1x10^5$ células/poço, correspondendo a uma condição de semi-confluência, sob as mesmas condições, o monômero mostrou efeito indutor de diferenciação e promoveu o aparecimento de formas alongadas e organização de trabéculas entre grupos de células em proliferação, mais arredondadas e dispostas em estruturas multicamada. O dímero limitou a proliferação e a diferenciação, as culturas apresentaram-se predominantemente dispostas em monocamadas formadas por células pequenas e esféricas ou poligonais pouco alongadas, tendendo a confluência. Imagens do desenvolvimento celular das culturas em semi-confluência, durante 96h de cultivo, foram obtidas a cada 24h e estão mostradas na Figura 11.

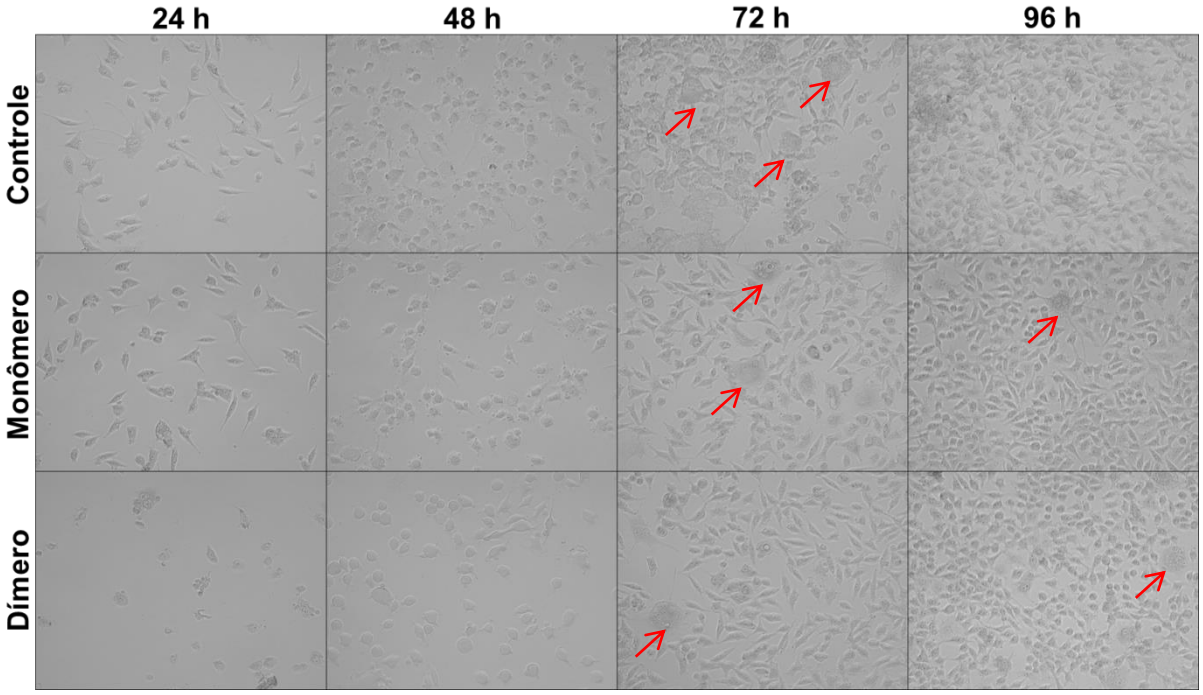


**Figura 10.** Efeito de $\beta_2$GPI sobre a proliferação e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em baixa confluência. Substrato: Matrigel®; inoculo inicial: $5x10^3$ células/poço; Meio: RPMI sem suplementação de SFB. As setas indicam a morfologia de *Tip cell*.

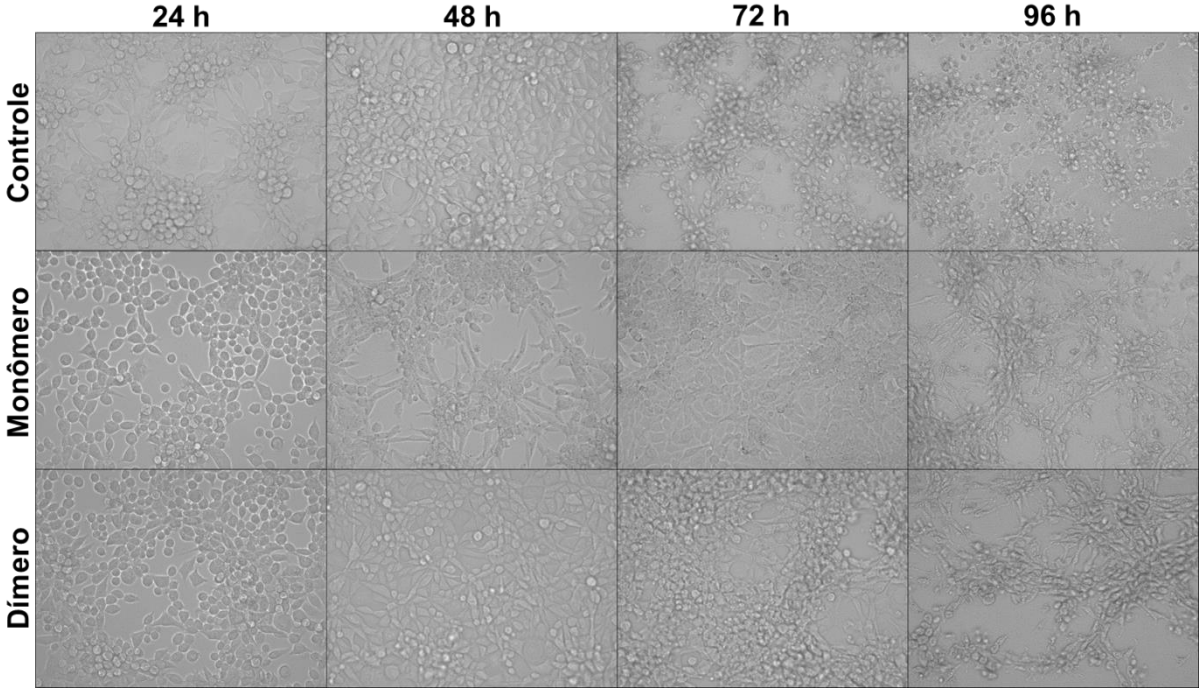


**Figura 11**. Efeito de $\beta_2$GPI sobre a proliferação e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em semi-confluência. Substrato: Matrigel®; inóculo inicial: $1x10^5$ células/poço; Meio: RPMI sem suplementação de SFB.

### 4.3. Efeito *in vivo* de $\beta_2$GPI sobre a angiogênese

A exposição ao dímero de $\beta_2$GPI, no 4º dia de incubação *in vivo*, induziu a morte embrionária precoce. Quarenta e oito horas após a exposição, os vasos do saco vitelino, em alguns casos, apresentaram-se completamente involuídos, a CAM não se desenvolveu ou regrediu, o embrião interrompeu seu desenvolvimento, perdendo a viabilidade sem atingir o estágio compatível com o tempo de incubação correspondente, gerando embriões que se parecem com massas amorfas aderidas à casca dos ovos. Em alguns casos em que o desenvolvimento do embrião também foi interrompido, os vasos do saco vitelino permaneceram presentes, mas também foi observada a regressão em outros. Nestes casos, no entanto, a CAM não se formou ou involuiu e os embriões apresentaram-se à macroscopia bastante hemorrágicos, edemaciados e maiores que os embriões controle.

Ao analisarmos o tamanho destes embriões (Tabela 1) observamos que os embriões controle apresentaram, em média, o comprimento cabeça-cauda de 1,90cm, enquanto os embriões tratados com a porção dimérica da proteína, cujo desenvolvimento foi interrompido no sexto dia, mediram 2,27cm. Quanto à

massa corporal, os embriões controle apresentaram uma média de 0,364g e os embriões que se desenvolveram após o tratamento com o dímero, 0,436g.

Diferentemente ao dímero, a exposição ao monômero de $\beta_2$GPI, no 4º dia de incubação *in vivo*, permitiu o desenvolvimento do embrião até o 10º dia, mas induziu alterações no desenvolvimento dos vasos da membrana corioalantóide.

Buscando evidenciar a morfologia dos embriões no mesmo tempo e condições de incubação o desenvolvimento do grupo controle e do grupo tratado com a fração monomérica da proteína foi interrompido no 6º dia. Desta maneira, os aspectos macroscópicos dos ovos expostos e dos embriões estão mostrados nas Figuras Figura 12 e Figura 13.

O desenvolvimento dos embriões expostos ao monômero não mostrou alterações tão importantes quanto às observadas com o dímero na macroscopia em nenhum dos intervalos de desenvolvimento (6º e 10º dia de incubação). No menor período, os embriões tratados com o monômero apresentaram um comprimento médio cabeça-cauda de 1,84cm e massa corporal média de 0,406g (Tabela 1; Figura 13).

Após 10 dias de incubação, as medidas de comprimento cabeça-cauda mantiveram a mesma relação percentual, 3,65 cm para o grupo controle e 3,40 cm para o grupo tratado com a fração monomérica, A massa corporal média do grupo controle aos 10 dias de incubação foi de 1,660g e a do grupo exposto ao monômero, de 1,963g. Os registros dos resultados da exposição ao monômero com o controle correspondente estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 14.

**Tabela 1.** Tamanhos e pesos dos embriões analisados após 6 dias de incubação

| | Controle | | Monômero | | Dímero | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Comprimento cabeça-cauda (cm) | Peso (g) | Comprimento cabeça-cauda (cm) | Peso (g) | Comprimento cabeça-cauda (cm) | Peso (g) |
| | 2,09 | 0,470 | 1,94 | 0,488 | 2,53 | 0,493 |
| | 1,99 | 0,481 | 2,11 | 0,537 | 2,13 | 0,287 |
| | 2,06 | 0,530 | 1,83 | 0,413 | 2,14 | 0,530 |
| | 2,15 | 0,511 | 2,06 | 0,525 | * | * |
| | 2,15 | 0,502 | 1,95 | 0,402 | * | * |
| | 1,66 | 0,244 | 1,12 | 0,074 | | |
| | 1,80 | 0,388 | | | | |
| | 1,77 | 0,163 | | | | |
| | 1,70 | 0,140 | | | | |
| | 1,64 | 0,113 | | | | |
| Média | 1,90 | 0,364 | 1,84 | 0,406 | 2,27 | 0,436 |
| Desvio Padrão | 0,207 | 0,184 | 0,364 | 0,172 | 0,228 | 0,131 |

O sinal (*) representa os embriões aderidos à casca dos quais não foi possível obter informações

**Tabela 2.** Tamanhos e pesos dos embriões analisados após 10 dias de incubação

| | Controle | | Monômero | |
|---|---|---|---|---|
| | Comprimento cabeça-cauda (cm) | Peso (g) | Comprimento cabeça-cauda (cm) | Peso (g) |
| | 3,70 | 1,790 | 3,50 | 1,730 |
| | 3,60 | 1,530 | 3,50 | 2,200 |
| | | | 3,20 | 1,960 |
| Média | 3,65 | 1,660 | 3,40 | 1,963 |
| Desvio Padrão | 0,071 | 0,184 | 0,173 | 0,235 |

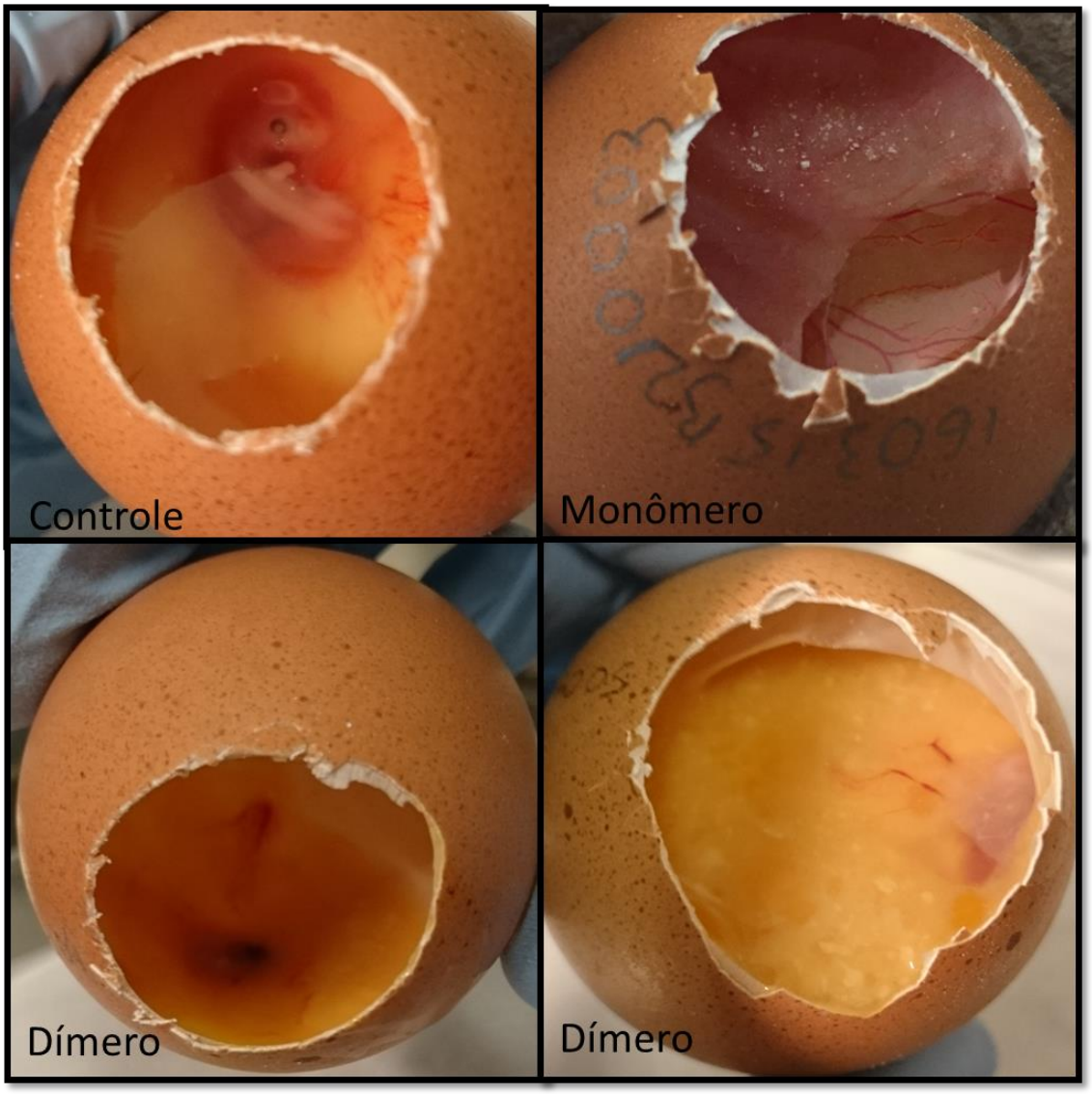


**Figura 12.** Aspecto macroscópico da membrana corioalantóide (CAM) *in vivo* após tratamento com $\beta_2$GPI, no 6º dia de incubação, 2º dia após a exposição. A imagem superior esquerda representa o aspecto macroscópico do ovo controle e a imagem superior direita, representa o aspecto do ovo tratado com monômero. As imagens inferiores representam as diferenças do aspecto macroscópico dos ovos tratados com a fração dimérica da proteína, quando os vasos regridem e resta apenas uma massa amorfa correspondente ao embrião e quando o embrião se desenvolve, mas tem sua viabilidade interrompida e a sua CAM regride.

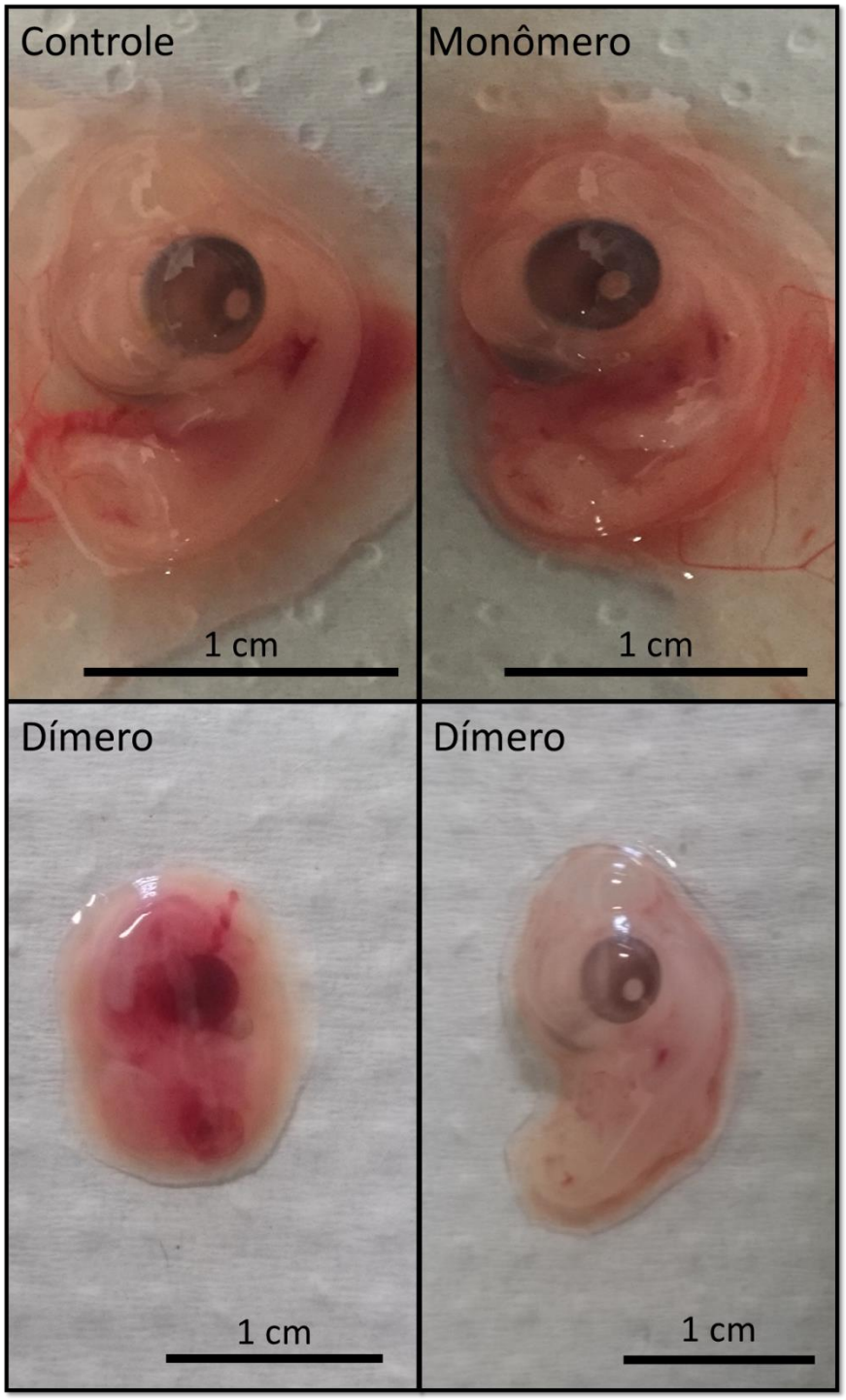


**Figura 13**. Aspecto macroscópico dos embriões após tratamento com $\beta_2$GPI, no 6º dia de incubação, 2º dia após a exposição. A imagem superior esquerda representa o aspecto macroscópico do embrião controle e a imagem superior direita, representa o aspecto do embrião tratado com a fração monomérica da proteína. As imagens inferiores representam as diferenças do aspecto macroscópico dos embriões tratados com a fração dimérica da proteína, quando os vasos regridem e resta apenas uma massa amorfa correspondente ao embrião e quando o embrião se desenvolve, mas tem sua viabilidade interrompida e a sua CAM regride, restando apenas a membrana do saco vitelino.

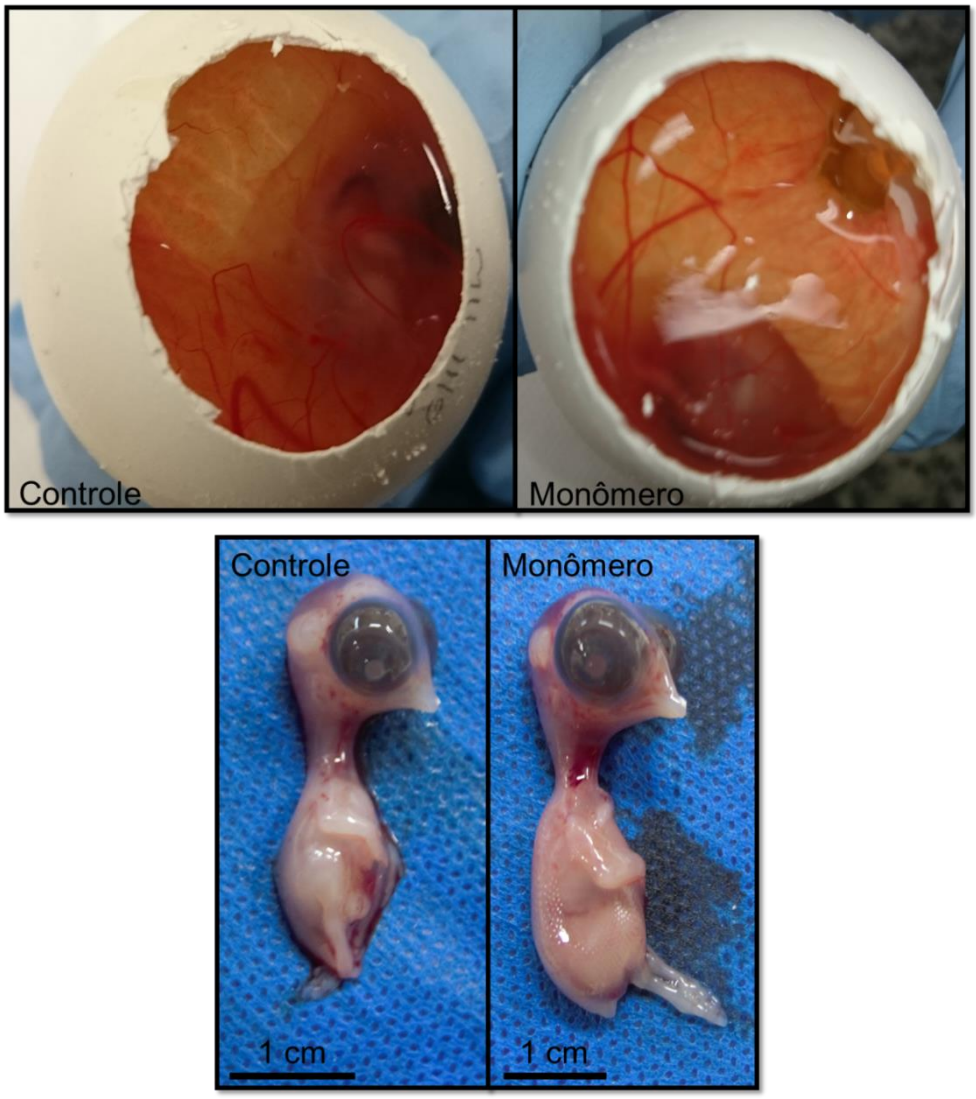


**Figura 14.** Aspecto macroscópico da membrana corioalantóide (CAM) *in vivo* e dos embriões após tratamento com monômero de $\beta_2$GPI, no 10º dia de incubação, 6º dia após a exposição. A imagem superior representa o aspecto macroscópico das membranas ainda dentro do ovo. A imagem inferior representam os aspectos macroscópicos dos embriões no 10º dia de incubação, o embrião controle e o tratado com a fração monomérica da proteína, respectivamente.

Ao exame em lupa estereoscópica da CAM, foram observados os padrões das ramificações dos vasos dos ovos dos grupos e dos ovos expostos à fração monomérica da proteína. As CAMs dos ovos controle apresentaram vasos organizados em padrão organizado em árvore (dendrítica) de ramificação com distribuição com ocorrências predominantemente simétricas, respeitando um padrão de hierarquia das ramificações vasculares sequenciais em relação ao calibre dos vasos e à distância entre as ramificações. Apresentaram, tipicamente, entre três e seis ramificações sequenciais entre os vasos mais finos e os mais calibrosos da membrana (Figura 15).

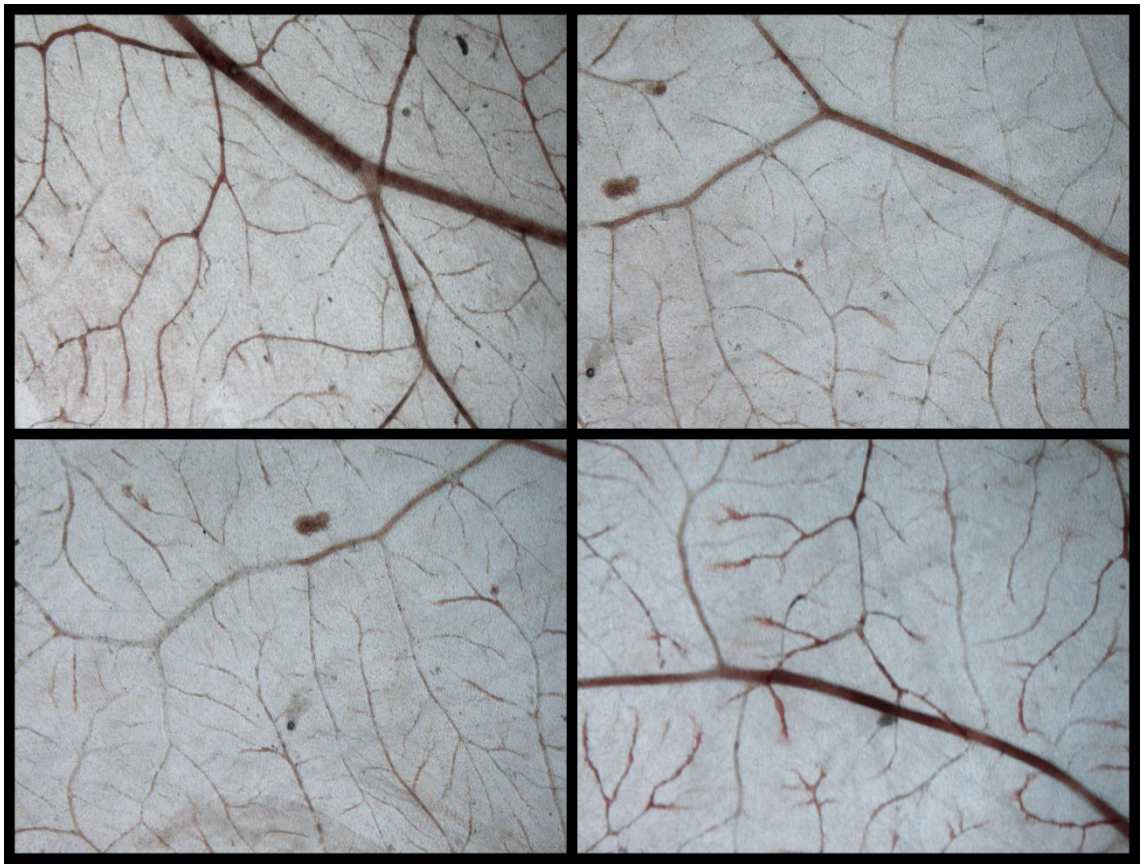

**Figura 15.** Imagens da membrana corioalontóica de ovos controles após 10 dias de incubação. As imagens foram obtidas em Lupa estereoscópica Nikon SMZ1800, no aumento de 1x. É possível evidenciando o preenchimento dos capilares e a hierarquia da rede vascular normal. Na CAM do embrião controle os vasos apresentaram tipicamente entre três e seis ramificações sequenciais entre os vasos mais finos e os mais calibrosos observáveis na rede vascular da CAM.

Já a CAM dos embriões expostos ao monômero evidenciou uma diferença quanto ao respeito de hierarquia dos vasos, ocorrendo grande quantidade de vasos com segmentos longos sem nenhuma ramificação ou com ramificações assimétricas, das quais se originavam algumas vezes vasos paralelos. Foram observadas regiões com poucos brotamentos vasculares terminais e presença de anastomoses, ingurgitamento dos ramos mais calibrosos e de percursos de percolação, indicando alterações na pressão e no preenchimento da rede capilar (Figura 16).

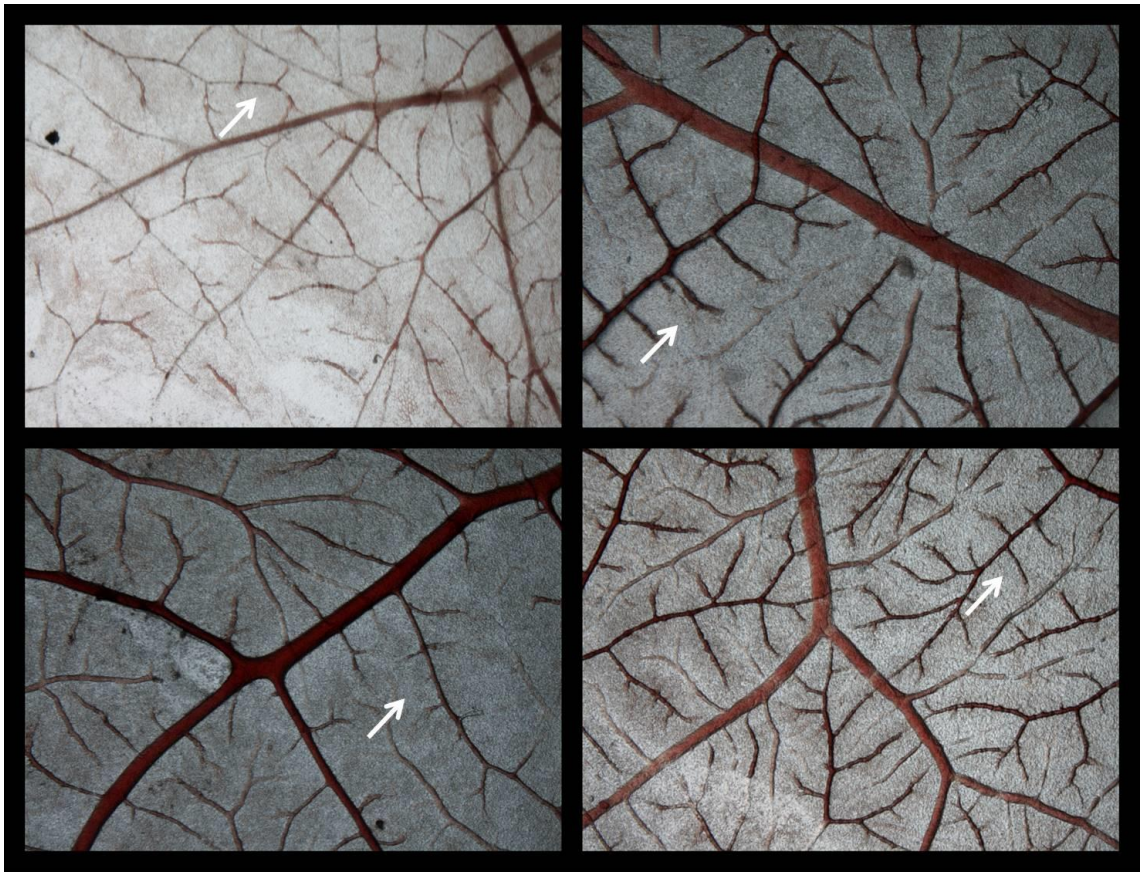

**Figura 16.** Imagens da membrana corioalontóica de ovos tratados com a fração monomérica da $\beta_2$GPI após 10 dias de incubação. As imagens foram obtidas em Lupa estereoscópica Nikon SMZ1800, no aumento de 1x. Na CAM do embrião tratado com a fração monomérica da $\beta_2$GPI foi possível encontrar número de ramificações sequenciais mais reduzidas do que nos ovos controle, tipicamente entre duas e três. As setas indicam exemplos de padrões paralelos presentes na estrutura da rede vascular

As imagens da CAM dos embriões de 6 dias, obtidas em escâner ultrassensível, revelaram que nesse período de incubação já é possível encontrar alterações estruturais na rede vascular. A CAM do controle mostra-se compatível com a estrutura de organização da rede vascular compatível com este estágio de desenvolvimento e início da formação das estruturas hierárquicas (Figura 17).

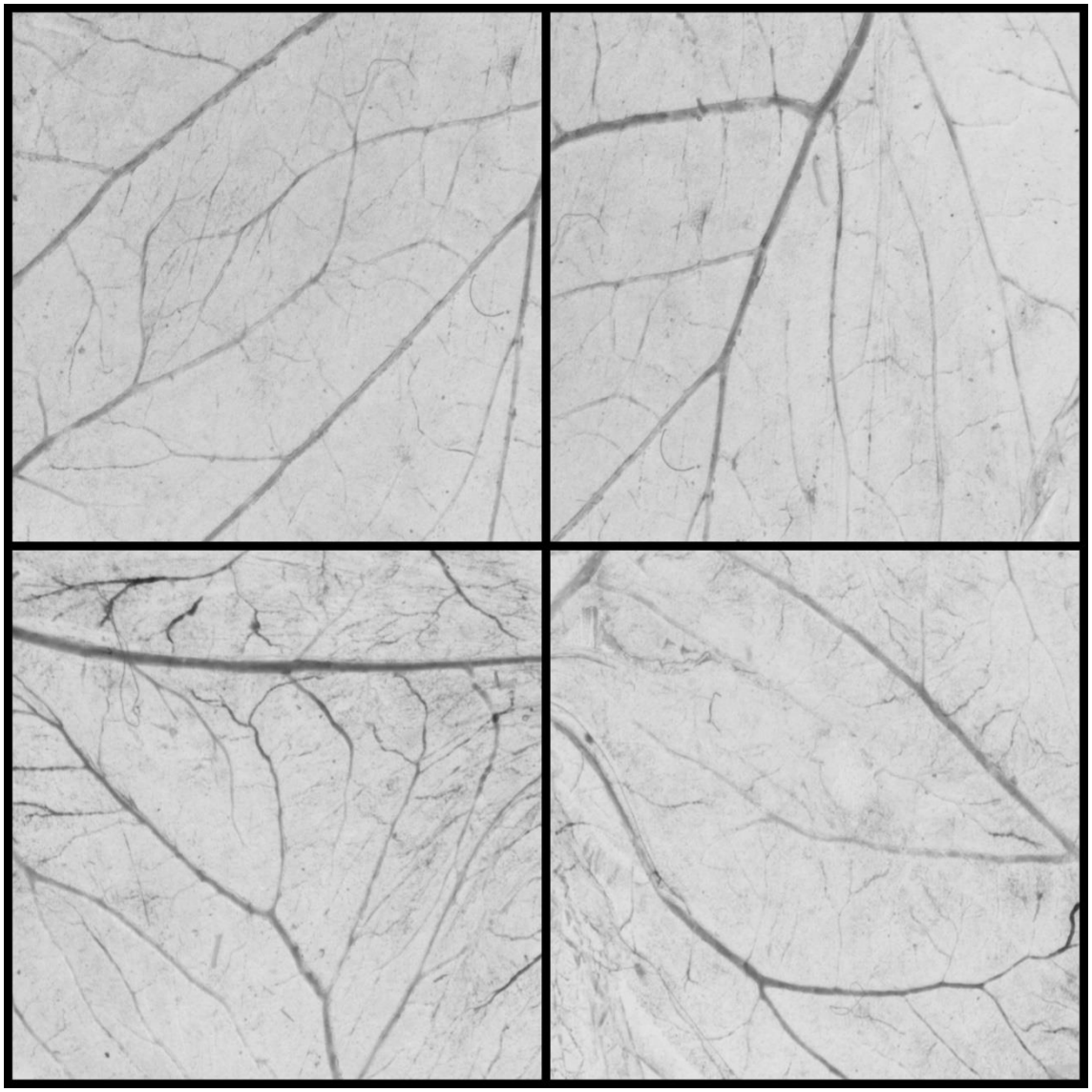

**Figura 17.** Imagens da membrana corioalontóica de ovos controle após 6 dias de incubação. As imagens foram obtidas em escâner ultrassensível ZooScan, com resolução de 1200dpi, em escalas de cinza. É possível observar a hierarquia da rede vascular normal. Na CAM do embrião controle os vasos apresentaram tipicamente entre três e seis ramificações sequenciais entre os vasos mais finos e os mais calibrosos observáveis na rede vascular da CAM.

Na CAM dos embriões expostos ao monômero da proteína (Figura 18), a hierarquia dos vasos mostrou uma organização mais pobre, quando comparada ao grupo controle. Assim como no estágio de 10 dias, os vasos dos ovos expostos ramificaram menos e ocorreu o fenômeno dos vasos paralelos. Não foi possível coletar amostras de CAM dos embriões tratados com a fração dimérica da proteína, pois elas involuiram ou não resistiram à manipulação, mesmo a mais delicada.

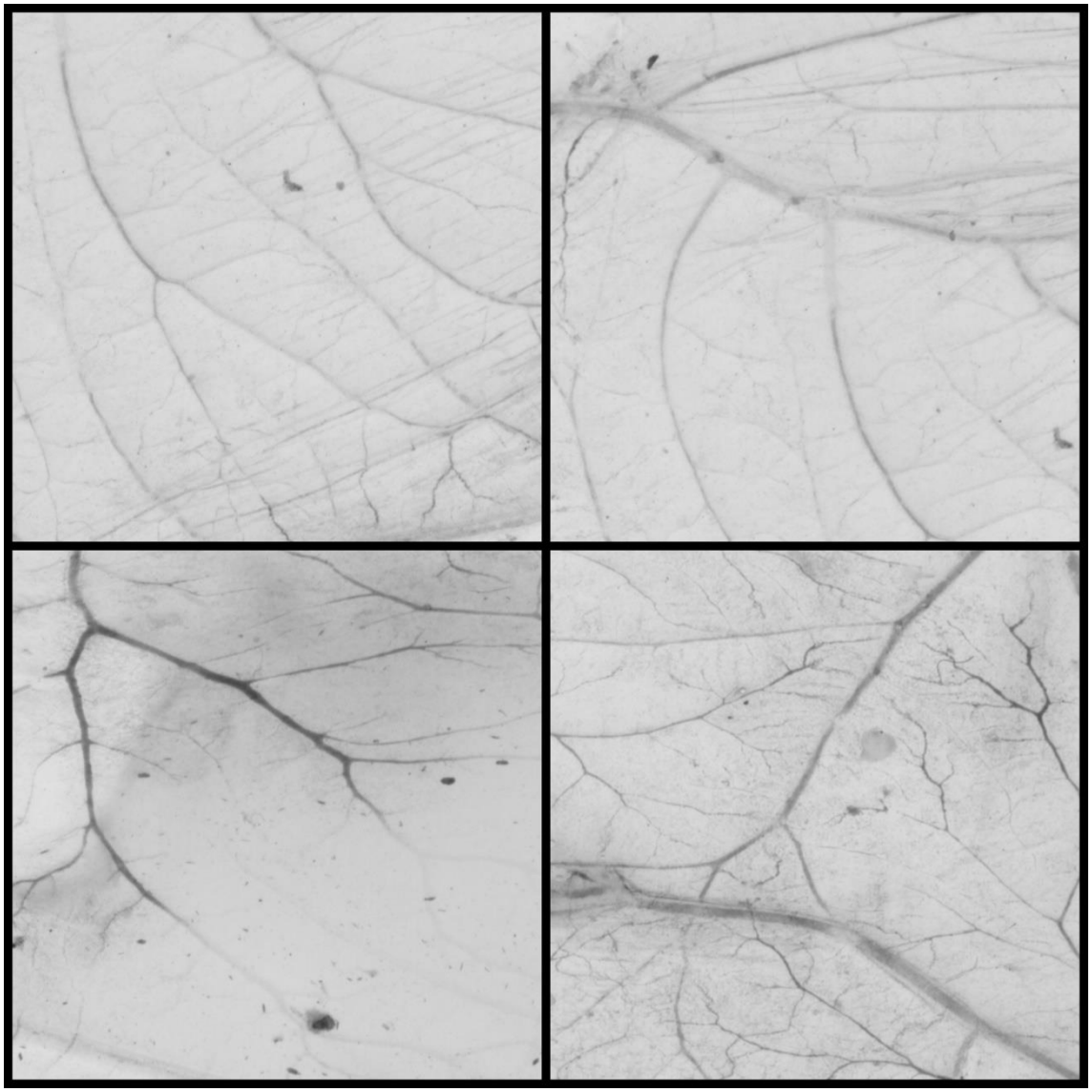

**Figura 18.** Imagens da membrana corioalontóica de ovos tratados com a fração monomérica da proteína após 6 dias de incubação. As imagens foram obtidas em escâner ultrassensível ZooScan, com resolução de 1200dpi, em escalas de cinza. Na CAM do embrião tratado com a fração monomérica da $\beta_2$GPI foi possível encontrar número de ramificações sequenciais mais reduzidas do que nos ovos controle, tipicamente entre duas e três.

### 4.4. Análise matemática da CAM através de descritor LBP

Os padrões binários locais (LBP) foram utilizados como descritores de textura com intuito de analisar as estruturas da microcirculação e identificar padrões que permitissem classificar as imagens e discriminar entre os grupos controle e amostra.

Exemplos do resultado destas análises feitas nas imagens da CAM do grupo controle e do grupo tratado com a fração monomérica de $\beta_2$GPI estão apresentados nas Figuras Figura 19 e Figura 20. É possível perceber que com a alteração dos raios utilizados para a definição da região local analisada, os vasos menores e a microcirculação ficam mais contrastados com o fundo, porque aumentam as ocorrências de padrões não uniformes no fundo, em relação às ocorrências dos padrões uniformes associados às paredes dos vasos. Embora os histogramas resultantes em cada uma das imagens sejam diferentes, sua forma e proporções entre as densidades dos padrões binários analisados são relativamente semelhantes. Isso nos permite observar um comportamento padrão para as imagens da CAM nas diferentes análises e também verificar a tendência de variação das densidades dos padrões binários à medida que se analisam as texturas em regiões locais de tamanhos diferentes.

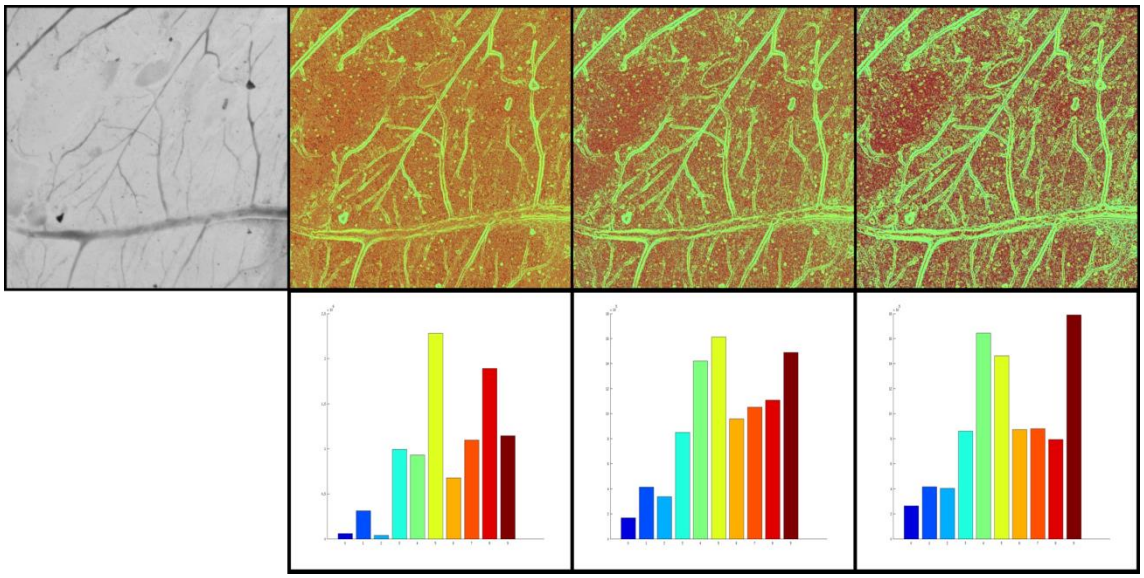

**Figura 19.** Exemplo da análise realizada em uma das imagens obtidas da CAM do grupo controle após 6 dias de incubação. A primeira imagem da linha superior representa a imagem originas, e as demais imagens o resultado após a submissão ao método utilizando regiões locais diferentes, r=1, r=2 e r=3, respectivamente. A linha inferior apresenta os histogramas referentes a cada uma das imagens resultantes

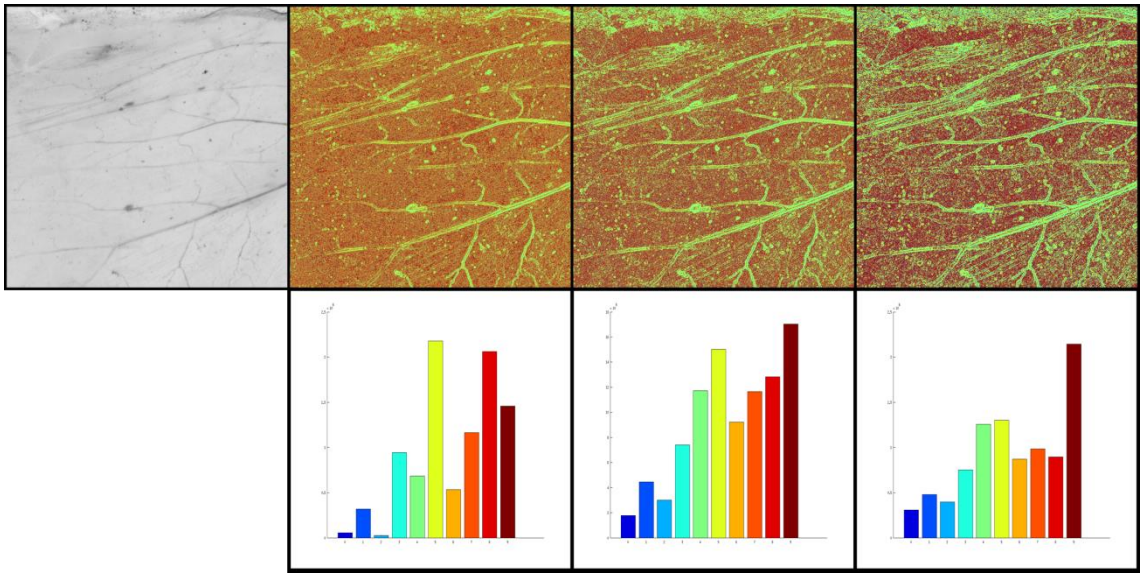

**Figura 20.** Exemplo da análise realizada em uma das imagens obtidas da CAM do grupo submetido ao monômero de $\beta_2$GPI após 6 dias de incubação. A primeira imagem da linha superior representa a imagem originas, e as demais imagens o resultado após a submissão ao método utilizando regiões locais diferentes, r=1, r=2 e r=3, respectivamente. A linha inferior apresenta os histogramas referentes a cada uma das imagens resultantes

As imagens quantitativas resultantes permitiram também investigar características das imagens relacionadas à estrutura da rede vascular presente nas amostras com diferentes instrumentos de captura. As frequências de distribuição dos padrões binários nas imagens de lupa e de escâner obtidas de uma mesma membrana mostraram-se bastante semelhantes, e também foram bastante semelhantes num conjunto de imagens analisadas de campos diferentes em uma mesma membrana. Este tipo de análise é capaz de discriminar entre texturas devidas à informação de interesse e texturas capturadas e registradas nas imagens como ruídos de fundo. Assim, em todo o conjunto de imagens, definiram-se as estruturas vasculares de interesse, caracteristicamente, pelo mesmo conjunto de padrões uniformes predominantes, com alguma variação na proporção relativa entre os diferentes padrões.

Em cada grupo (controle ou amostra), as membranas de diferentes indivíduos também mostraram um padrão relativamente homogêneo para o perfil de frequências dos LBPs uniformes nas suas respectivas imagens com uma dispersão intragrupo menor para as amostras de indivíduos controles para todos os LBPs. Diferentes tempos de incubação e diferentes tratamentos resultaram em diferenças intergrupos maiores na distribuição dos perfis

individuais dos LBPs do que as observadas intragrupos, tanto para os indivíduos do grupo controle quanto para os indivíduos do grupo tratado com a proteína, resultando, em vários casos, uma mudança qualitativa no perfil de distribuições. Esses efeitos foram mais pronunciados nas amostras de 6 dias de incubação do que nas amostras de 10 dias de incubação.

Uma síntese dos resultados obtidos está mostrada nos gráficos da Figura 21. Box Plot da análise das imagens das texturas da CAM nos ensaios de 6 dias, para r=1. Aos 6 dias de incubação, os grupos mostraram padrões associados às paredes dos vasos mais densos nos controles do que nas amostras, enquanto que as imagens de texturas do fundo e da microcirculação foram mais densos nas amostras do que nos controles.

Nas imagens de 10 dias (Figura 22), a variação dos dados do grupo tratado com o monômero permaneceu maior que a do grupo controle, ambos apresentaram distribuição assimétrica. No entanto, o grupo controle apresentou mais ocorrências em que a média e a mediana eram próximas ou coincidentes. A maior variação do padrão de texturas da CAM parece estar associada a uma rede mais ramificada no grupo controle e com uma maior densidade de pequenos vasos, enquanto o grupo tratado mostrou vasos maiores mais preenchidos e uma rede capilar menos densa, mais interconectada por anastomoses e com mais terminais abertos de aspecto sincicial, ou seja, a metodologia de análise foi capaz de evidenciar diferenças que podem ser correlacionadas com a estrutura da rede vascular da CAM, relativas a efeitos sobre o desenvolvimento e funcionalidade dos percursos de percolação.

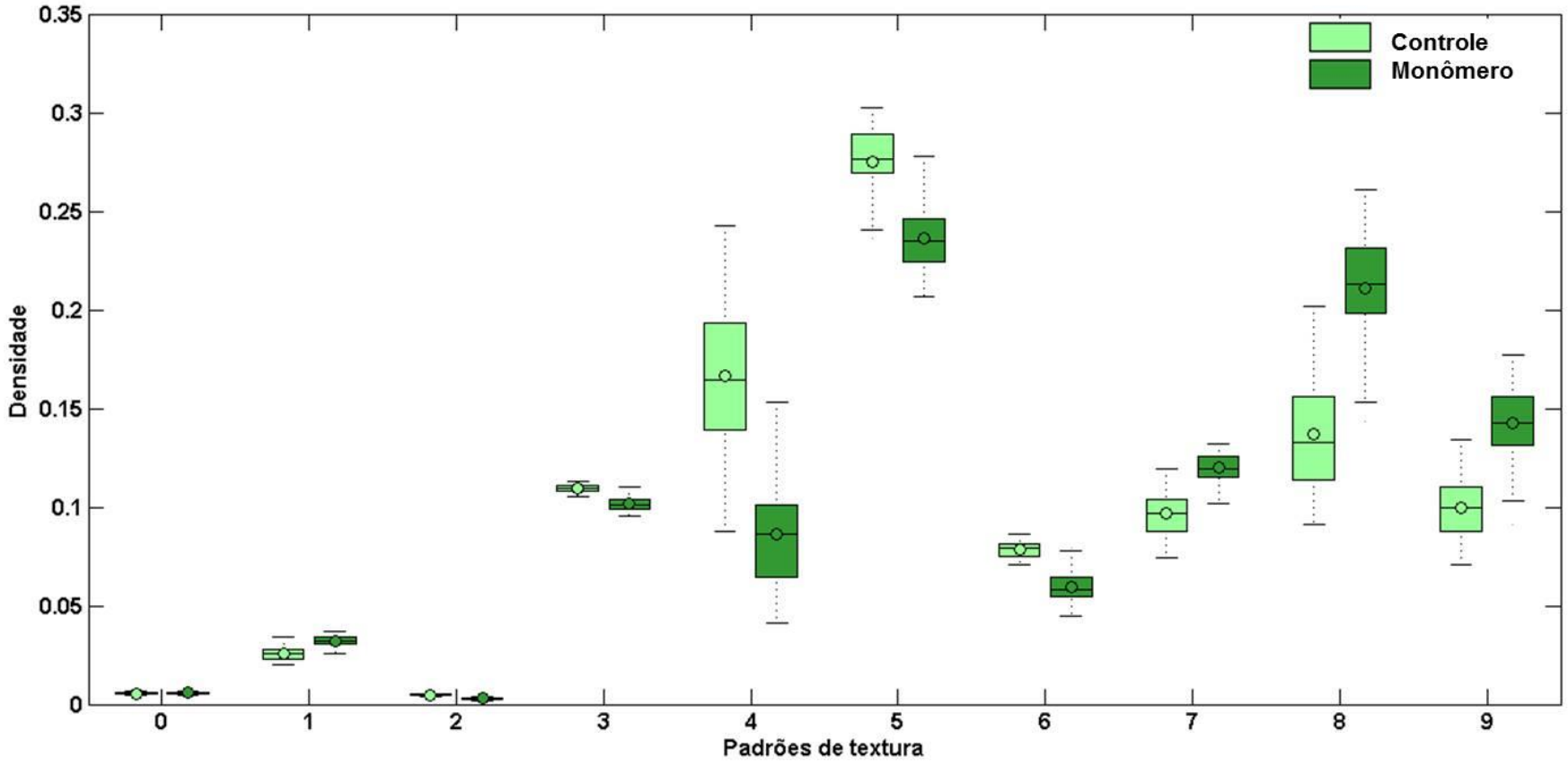


**Figura 21.** Box Plot da análise das imagens das texturas da CAM nos ensaios de 6 dias, para r=1

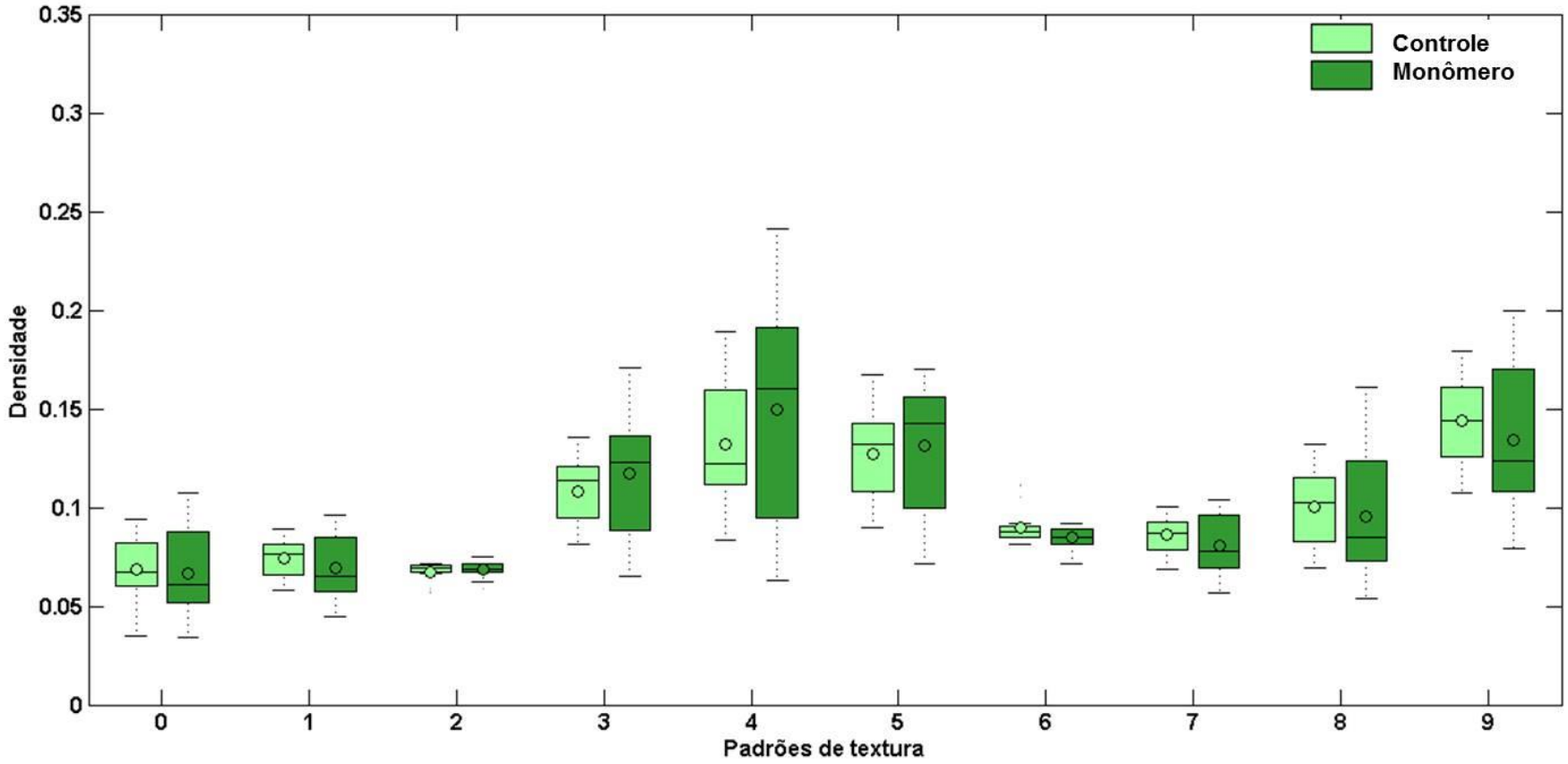


**Figura 22.** Box Plot da análise das imagens das texturas da CAM nos ensaios de 10 dias, para r=1

## 5. DISCUSSÃO

A ação sobre a angiogênese é apenas uma parte das funções fisiológicas descritas para a $\beta_2$GPI e a multiplicidade de seus efeitos reitera as vias de sinalização intracelular como prováveis alvos bioquímicos para sua função. Diversos autores relataram o efeito da proteína sobre a angiogênese, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Rakic et al., 2003; Beecken et al., 2006; Sakai et al., 2007; Nakagawa et al., 2009; Passam et al., 2010b; Machado et al., 2013; Chiu et al., 2016). A abordagem utilizada neste trabalho não permitiu atribuir uma via alvo específico para os efeitos anti-angiogênicos da proteína. Entretanto, foi possível verificar uma compatibilidade entre os efeitos da $\beta_2$GPI observados *in vitro* e *in vivo* com as outras observações relatadas na literatura, e basear nisso a proposta de a clivagem e a dimerização da proteína em situações de ativação inflamatória desempenhe um efeito regulador do crescimento e da maturação vascular dependente de endotélio.

Os efeitos da $\beta_2$GPI sobre a proliferação e diferenciação celular *in vitro* levaram à modificação na composição da população celular em seus fenótipos de diferenciação envolvidos na formação e estabilização de brotos vasculares e foram dependentes da subfração inoculada. Analogamente, no modelo da CAM, observaram-se anomalias estruturais da rede vascular relacionadas a perdas de complexidade e simetria ou até mesmo a ausência de ramos vasculares decorrente de provável interrupção do desenvolvimento ou indução precoce de regressão vascular.

Os efeitos das subfrações de purificação da $\beta_2$GPI, observados *in vitro* e *in vivo* confirmam sua ação sobre a angiogênese e também a possibilidade de uma regulação dessa ação em situações inflamatórias, como previamente descrito (Gomes et al., 2002). Os efeitos diferenciais das duas subfrações sobre o endotélio vascular sugerem que a sinalização intracelular ocorre como parte da fisiopatologia do desenvolvimento da rede vascular embrionária. Este resultado implica a inativação ou a clivagem induzidas por inflamação ou autoimunidade como possíveis mediadores de alterações do desenvolvimento embrionário, além das ações já bem descritas sobre a coagulação e fibrinólise.

A comparação entre os parâmetros quantitativos da análise da morfologia indica que é possível, como ocorreu com as culturas celulares, que os efeitos diretos da $\beta_2$GPI sobre a angiogênese sejam dependentes da ocorrência de clivagem e dimerização e que sejam autolimitados e reversíveis. Serão necessários novos estudos para comprovar esta hipótese, com um desenho experimental que permita a observação do efeito em condições de preservação da viabilidade do embrião.

Embora os resultados desse trabalho sejam pioneiros na descrição dos efeitos das subfrações da proteína, os efeitos de $\beta_2$GPI sobre as vias bioquímicas de sinalização da Akt e das MAPKs, mais especificamente da família ERK 1/2, JNK e p38 já foram relatados na literatura. Estas vias são importantes no processo de angiogênese e relevantes para a fisiologia e o desenvolvimento do sistema cardiovascular (Feuerstein e Young, 2000; Regan et al, 2002; Yang et al., 2000; Bi et al., 1999).

A ação da $\beta_2$GPI sobre a fosforilação das MAPK foi observada por Beecken et al. (2010) em ensaios *in vitro* de angiogênese. As formas nativa e clivada da proteína mostraram efeitos inibitórios sobre o crescimento e a proliferação de HUVECs, sendo a forma clivada mais ativa. A forma clivada da proteína também inibiu a formação de tubos, reduziu a proliferação celular e modificou a regulação do ciclo celular; com alterações na fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 e expressão de proteínas efetoras e controladoras do ciclo celular em células EOMA. Os efeitos da forma clivada mostraram-se dependentes de anexina II (anx-2), sugerida como um ligante funcional de $\beta_2$GPI à superfície da célula endotelial (Beecken et al., 2010). Além disto, Chiu et al. (2016) também apresentou dados que demonstram que, quando induzida por VEGF, a $\beta_2$GPI inibe a angiogênese de células endoteliais aórticas humanas (HAECs) através da supressão da fosforilação de ERK 1/2, Akt e eNOS.

As anexinas estão bastante envolvidas em processos fisiológicos, como a regulação do crescimento e diferenciação celular, apoptose, fusão de membrana, exocitose, bem como eventos de sinalização celular e processos anti-inflamatórios. Dentro desta grande família, a anx-2 é descrita por modular

o processo de angiogênese e atuar como inibidor de fibrinólise (Hayes e Moss, 2004).

A anx-2 está associada à micropartículas endoteliais, que são marcadores de disfunção endotelial, participam da lesão vascular, no processo de aterogênese, desenvolvimento de rigidez arterial e comprometimento da angiogênese (VanWijk et al., 2003; Banfi et al., 2005; Mezentsev et al., 2005; Chironi et al., 2009).

Existem estudos que demonstram que alterações na expressão de anx-2 podem estar relacionadas com as interações célula-célula prejudicadas em ensaios *in vitro*, por falta de adesão celular e alterações da via de sinalização Akt (Su et al., 2010; Di Marco et al., 2013). Além disto, quando se trata de sua relação com o processo de angiogênese, quando agentes se ligam a anx-2 na superfície da célula ocorre à indução da apoptose nas células endoteliais e a regressão da angiogênese (Sharma et al., 2007; Lima e Silva et al., 2010). Também há relatos de alterações no desenvolvimento de animais deficientes de anx-2, sendo menores e com ramificações dos vasos menos desenvolvidas (Ling et al., 2004). Bem como, alterações sobre anx-2 levam a mudanças na sinalização da via Akt (Su et al., 2010; Peng et al., 2011).

O aumento e a diminuição da ativação da via PI3K/Akt provocam defeitos vasculares e angiogênese disfuncional com as mesmas características observadas em nossos ensaios. Segundo a literatura, a inibição da via PI3K/Akt resulta em redução da capilarização e arteriogênese, com redução na fosforilação de eNOS, na proliferação das células endoteliais e na produção de NO (Madeddu et al., 2008). A supressão completa da função da Akt produz vasos mal formados e prejudica o recrutamento de progenitoras em resposta a VEGF em animais knockout (Chen et al., 2005). A Akt está descrita como um elemento importante na reparação vascular e cardíaca pós-isquemica (Abid et al., 2004; Ackah et al., 2005; Ceci et al., 2007; Mukai et al., 2006; Ouchi et al., 2008; Schiekofer et al., 2008), porém sua sobre-expressão produz remodelação vascular anormal e defeitos vasculares fatais em ratos (Chen et al., 2005; Phung et al., 2006).

Um novo alvo considerado a partir dos ensaios *in vitro*, a via Notch determina a formação de vasos funcionais durante a angiogênese embrionária

e em diversos modelos de angiogênese tumoral. Entre as moléculas de sinalização transmembrana que participam desta sinalização, a expressão de Dll4 é precoce durante a vasculogênese, Dll4 é o primeiro ligante Notch expresso no endotélio arterial (Chong et al., 2011) e a sua expressão é induzida por VEGF (Lawson et al., 2001). A perda de um alelo de Dll4 produz defeitos de especificação artério-venosa e letalidade embrionária em ratos (Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004; Krebs et al., 2004). A sinalização Notch é ativada por VEGF, MAPKs e fatores de transcrição ETS, e regula a expressão de Dll4 e Notch4 em um ciclo de feedback positivo para determinar a especificação arterial (Caolo et al., 2010; Wythe et al., 2013).

A inibição de Dll4 estimula a angiogênese durante a vascularização tumoral, aumenta os brotamentos e a ramificação. No entanto, este aumento é improdutivo e leva à queda na perfusão, aumentando a hipóxia, havendo assim uma rede vascular não funcional, incapaz de manter o crescimento tumoral. Esta inibição do crescimento de tumores por bloqueio de Dll4 é vista em diversos modelos de tumor (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Scehnet et al., 2007).

Desta maneira, ressaltamos a correspondência entre os efeitos da $\beta_2$GPI observados *in vitro*, sobre o desenvolvimento de células endoteliais em culturas 2D (Machado et al., 2013) e 3D e as alterações no desenvolvimento embrionário e formação da rede vascular *in vivo* induzidas na presença da $\beta_2$GPI, compatíveis com inibição na sinalização Akt e Notch.

Por outro lado, na célula endotelial, o principal receptor relacionado à angiogênese não parece ser um ligante de $\beta_2$GPI. Em 2008, Yu e colaboradores, encontraram que a $\beta_2$GPI não se liga à molécula de VEGF ou de bFGF, mas reduz a expressão de VEGF-R2 e inibe, de forma dose-dependente, a formação de tubos sobre Matrigel e a proliferação de HUVECs induzida por VEGF ou bFGF em culturas 2D. O receptor VEGF-R1 não foi inibido, segundo os mesmos autores. Neste estudo, a forma clivada da proteína inibiu a fosforilação de Akt e ERK1/2. Mais recentemente, estes resultados foram confirmados em um modelo de células HAECs, nas quais a $\beta_2$GPI regulou o crescimento e a migração direcional das células endoteliais após a

indução com VEGF e inibiu a fosforilação de VEGF-R2, ERK1/2 e Akt (Chiu et al., 2013).

É através do receptor VEGF-R2 que o VEGF-A ativa enzimas de sinalização, incluindo MAPK, Akt, PKC e eNOS (Bekhite et al., 2011; Tong et al., 2014; Kim et al., 2015). Patenaude et al. (2014) demonstrou ainda que há uma relação de dependência de VEGF-R2 pela sinalização Notch para a indução da produção de NO. Pois, quando ocorre a inibição de Notch, em células endoteliais, há uma redução da produção de NO e da atividade de eNOS.

Resultados anteriores do nosso grupo (GOMES et al., 2002) mostraram que o efeito indireto da $\beta_2$GPI sobre a angiogênese pode ser adicionalmente modulado pela modificação da proteína *in vivo*. Este efeito indireto interfere potencialmente com a organização temporal dos eventos de crescimento e migração celular e com a proporção das frações de proliferação e diferenciação das células endoteliais. Estima-se que as células endoteliais em cultura sejam capazes de clivar monômeros de $\beta_2$GPI e promover a sua dimerização.

Relacionando-se a atividade da $\beta_2$GPI apenas com a clivagem e dimerização seria de se esperar que, nas células endoteliais expostas independentemente às subfrações da proteína, os efeitos fossem equivalentes ou proporcionais, ou que apenas a forma dimérica mostrasse alguma atividade. Entretanto, os efeitos das duas subfrações sobre as culturas apresentaram-se qualitativamente diferentes. Em nossos testes *in vitro*, a fração de purificação rica em monômeros de $\beta_2$GPI interferiu pouco com a proliferação de HUVECs e funcionou principalmente como um fator de diferenciação, enquanto a fração com predomínio de dímeros modulou negativamente a proliferação e a diferenciação. Os efeitos foram dependentes de densidade de plaqueamento e foram mais evidentes nas primeiras 24h, continuaram presentes após 48h e depois as culturas convergiram para um mesmo aspecto, sugerindo que a determinação de efeitos pode preceder a dimerização, que exista alguma hierarquia entre os sinais de monômero e dímero, ou que a atividade da proteína em cultura seja perdida por modificações subsequentes ou sequestro por outros substratos.

A exposição à fração de monômeros $\beta_2$GPI induziu a diferenciação celular e a formação de tubos de maneira mais exuberante nas culturas confluentes do que nas culturas com baixa densidade de plaqueamento. A fração contendo dímeros inibiu a diferenciação e a formação de tubos nas culturas confluentes. A proliferação foi limitada nas primeiras 48h por ambas as frações, porém nas culturas com baixa densidade de plaqueamento o dímero mostrou efeito mais intenso do que o monômero.

O monômero de $\beta_2$GPI é a fração que predomina fisiologicamente *in vivo*, porém a proteína encontra-se, nos fluidos biológicos, principalmente associada a superfícies negativas, em estruturas de agregação reversíveis, em equilíbrio com formas monoméricas solúveis ou formando dímeros (Brington e Chesterman, 1994; Goldsmith et al., 1994; Sanguera et al., 1997b; Averna et al., 2004). A afinidade da $\beta_2$GPI por substratos é modificada pela alteração conformacional resultante da dimerização. A formação do dímero, que inibe a proliferação e a diferenciação endotelial, é favorecida pela ligação de auto-anticorpos antifosfolipídio à proteína associada a superfícies negativas ou pela clivagem. A clivagem ocorre enzimaticamente pela ação da plasmina após a perda da integridade vascular e em eventos de trombose ou pela elastase durante a inflamação (Stella, 2009). Vários mecanismos cooperam para a capilarização necessária para o reparo tecidual. Os principais mecanismos de diferenciação terminal descritos são associados à via Notch de sinalização bioquímica.

Diferente das vias das MAPK, que integram diferentes estímulos para um conjunto comum de sinalizadores citoplasmáticos, a via Notch constitui um mecanismo intracelular dependente de moléculas transmembrana, que transduzem sinais iniciados ou amplificados pelo contato célula-célula. Esta via é a responsável pelo estabelecimento de diferentes fenótipos de crescimento, diferenciação e especificação da função das células endoteliais, para a formação de brotos vasculares pérvios e funcionais (Phng e Gerhardt, 2009).

Considerando a literatura, a ação diferencial de monômeros e dímeros de $\beta_2$GPI sobre as vias de sinalização da Akt e do Notch pode explicar os efeitos dependentes de confluência das culturas celulares observados com as diferentes

subfrações da $\beta_2$GPI sobre a proliferação e diferenciação de células endoteliais *in vitro*.

O efeito dos monômeros e dímeros de $\beta_2$GPI sobre o desenvolvimento dos embriões *in vivo* pode ser atribuído aos mesmos alvos bioquímicos nas vias de sinalização. Estas vias, quando alteradas, resultam em comprometimento da vasculogênese e angiogênese e também em anormalidade do desenvolvimento embrionário, inclusive com a ocorrência de letalidade precoce.

Nos embriões expostos à fração dimérica da proteína, a estrutura da CAM foi bastante ou totalmente alterada, observou-se o efeito de letalidade ao embrião e a indução de alterações morfológicas macroscópicas.

A anx-2, um potencial ligante da $\beta_2$GPI, também já foi associada ao endotélio da CAM. A anx-2 aparece como um marcador do endotélio capilar da camada coriônica durante todo o desenvolvimento embrionário. Especificamente no período estudado do desenvolvimento da CAM (E8-E12) a expressão da anx-2 foi demonstrada nos capilares da camada epitelial coriônica e em células basais da camada epitelial alantoide (Matschke et al., 2006). As alterações estruturais observadas na CAM das amostras tratadas com o monômero da proteína são compatíveis com alterações de vias de regulação de angiogênese como a Akt. As alterações morfológicas encontradas são semelhantes à de outras moléculas inibidoras de angiogênese testadas em outros estudos (Melkonian et al., 2002; Ejaz et al., 2006; Gatne et al., 2016).

As amostras de membrana mostraram efeitos sobre o desenvolvimento da rede já no 6º dia de incubação, compatíveis com efeitos sobre a proliferação e maturação das estruturas. Segundo a literatura, o desenvolvimento da CAM é marcado por diferentes fases. O período entre o 5º e o 7º dias do desenvolvimento é onde ocorre o maior crescimento de novos vasos na CAM, depois disso, do 8º ao 12º dia predomina a maturação do processo de angiogênese. Na fase seguinte, que se inicia entre o 13º e 14º dia a rede vascular se expande, mas sem aumento da complexidade (Schlatter et al., 1997). A fase correspondente ao 18º ao 21º dia é a fase de regressão, onde a maioria dos componentes está degenerando-se; contudo, tal processo é bem regulado e a transição entre as fases é gradual, já que a apoptose progressiva

das células é visível antes do 18º dia (Makanya et al., 2016). Os efeitos do dímero de $\beta_2$GPI também são compatíveis com uma ação sobre a via de regulação relacionada à depleção da anx-2, induzindo a degradação prematura dos vasos da CAM e inviabilizando a CAM no período em que a mesma estaria se desenvolvendo.

A análise matemática realizada utilizando LBPs tornou-se uma importante ferramenta para a análise quantitativa das estruturas da rede e deve permitir o refinamento dos resultados. Análises posteriores, empregando e morfologia matemática em imagens binárias da rede, foram propostas pelo grupo para o estudo da hierarquia das ramificações (De La Cruz, 2015). A grande qualidade da ferramenta aplicada neste grupo de amostras foi permitir utilizar imagens de diferentes fontes de captura sem comprometer as conclusões da análise e fornecer informação quantitativa já nesta etapa do processamento.

Este tipo de análise também depende da qualidade da amostragem do material biológico, uma vez que o sistema de LBP é extremamente sensível ao tipo de ruído que afeta o contraste da imagem (Liu et al., 2012). Mesmo assim, é mais adequada do que os métodos anteriormente empregados e permitiu ampliar o estudo para amostras cujos vasos são frágeis, uma vez que ao avaliar o contraste entre o pixel central e sua vizinhança, pode-se obter grande contraste entre estes pixels, mesmo que tal flutuação seja mínima. O efeito de aumentar o raio da região analisada permitiu observar melhor alguns detalhes da microcirculação.

A investigação dos efeitos sobre a estabilização da rede capilar foi conduzida em detalhes a partir da aplicação dessa ferramenta que permitiu estudar a estrutura da rede em condições em que os vasos apresentavam defeitos e vazamentos, prejudicando o contraste na imagem capturada.

A hipótese de que as vias da Akt e da Notch sejam alvos funcionais da $\beta_2$GPI também no modelo da CAM requer mais estudos para confirmação. As evidências observadas são compatíveis com efeitos de interferência sobre o desenvolvimento da rede vascular já descritos para ambas as vias. A CAM do grupo controle mostrou uma rede mais ramificada e uma maior densidade de pequenos vasos que se originam de um desenvolvimento mais coordenado

desde a etapa de expansão da microcirculação, enquanto o grupo tratado mostrou vasos maiores mais preenchidos, uma rede capilar menos densa, mais interconectada por anastomoses e, com mais terminais capilares abertos (*leaky*), originados de uma rede com atraso na formação de estruturas hierárquicas típicas na etapa de expansão. O aspecto de abertura dos capilares pode ser determinado pela inibição da via da anexina 2/Akt e pela não estabilização das paredes dos brotos vasculares, dependente de Notch. O efeito diferencial do monômero e do dímero de $\beta_2$GPI indica que a indução do efeito do monômero e a sua inativação ocorrem antes da clivagem e dimerização da proteína, no ambiente do modelo, ou que ela ocorre em pequena extensão. Sugerem também que a dimerização não é revertida *in vivo*, nas condições empregadas para o ensaio. Este resultado morfológico foi confirmado pelos efeitos macroscópicos observados nos embriões e pelas diferenças de viabilidade entre as duas subfrações, o dímero apresentando-se muito mais letal. A comparação dos efeitos obtidos nas culturas celulares e no modelo da CAM demonstraram, em escalas diferentes, que o efeito do monômero pode ser autolimitado e que a clivagem e a dimerização ampliam o efeito antiangiogênico da proteína.

## 6. CONCLUSÃO

*In vitro*, o monômero de $\beta_2$GPI não interfere diretamente com a proliferação de HUVECs, mas funciona como um fator de diferenciação, induzindo a formação de um fenótipo alongado, com prolongamentos e estruturas de interação célula-célula. O efeito do monômero de $\beta_2$GPI sobre a diferenciação das HUVECs é dependente da densidade de plaqueamento. O dímero de $\beta_2$GPI modula negativamente a proliferação e a diferenciação de HUVECs. O efeito de uma exposição única às subfrações da $\beta_2$GPI *in vitro* é transitório e reversível. Os efeitos observados são compatíveis com dados da literatura, que descrevem a inibição da via de sinalização Anexina 2/Akt pela $\beta_2$GPI. O monômero de $\beta_2$GPI modifica a determinação fenotípica associada à formação de células “tip” e “stalk” nas culturas de células endoteliais, sugerindo que a via Notch de sinalização possa ser alvo da $\beta_2$GPI.

*In vivo*, o dímero de $\beta_2$GPI impede a angiogênese e induz a morte embrionária em 48h após a exposição no 4º dia de incubação. O monômero permite o desenvolvimento do embrião até o 10º dia, mas induz alterações no desenvolvimento dos vasos da membrana corioalantóide. Os efeitos observados no modelo também são compatíveis com a inibição da sinalização pelas vias bioquímicas de Anexina 2/Akt e Notch.

## 7. REFERÊNCIAS


Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, Walsh K, Aird WC. Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004. 24:294–300.

Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC. Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005. 115: 2119–2127.

Agar C, van Os GMA, Morgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RHWM, Meijers JCM, de Groot PG. β2-glycoprotein I canexist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010. 116:1336-1343.

Alard J-E, Gaillard F, Daridon C, Shoenfeld Y, Jamin C, Youinou P. TLR2 is one of the endothelial receptors for β2-glycoprotein I. *The Journal of Immunology*. 2010. 185:1550-1557.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula. São Paulo: Artmed; 2004.

Aleporou-Marinou V, Pappa H, Yalouris P, Parargias T. Purification of apolipoprotein H (Beta2-glicoprotein I)- like protein from human folicular fluid. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. *Biochemistry & Molecular Biology*. 2001. Oxford, 128:537-542.

Arvieux J, Darnige L, Hachulla E, Roussel B, Bensa JC, Colomb MG. Species specificity of anti-β2-Glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitations. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1996. Stuttgard, 75:725-730.

Arvieux J, Regnault V, Hachulla E, Darnige L, Berthou F, Youinou P. Oxidation of beta2-glycoprotein I (beta2GPI) by the hydroxyl radical alters phospholipid binding and modulates recognition by anti-beta2GPI autoantibodies. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001. 86:1070-1076.

Aste-Amézaga M, Zhang N, Lineberger JE, Arnold BA, Toner TJ, Gu M, Huang L, Vitelli S, Vo KT, Haytko P, et al. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *Plos One*. 2010, 5:1-13.

Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: A review. *Pharmacology & Therapeutics*. 1991. 51:1-11.

Averna M, Paravizzini G, Marino G, Emmanuele G, Cefalu AB, Magro G, Bartoloni G, Ragusa M, Noto DE, Barbagallo CM, Callari D, Mazzarino JC, Notarbartolo A, Travali S. β2-glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. Oxford, 36:1297-1305.

Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. Endotélio e arterosclerose. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro; 2004. 17:26-32.

Balasubramanian K, Chandra J, Sschroit A. Immune clearance of phosphatidylserine|sertine-expressing cells by phagocytes: the role of β2-glycoprotein I in macrophage recognition. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997. Baltimore, 272:31113-31117.

Balasubramanian K, Killion JJ, Schroit AJ. Estimation of plasma beta-2-glycoprotein levels by competitive ELISA. *Thrombosis Research*. 1998. 92:91.

Banfi C, Brioschi M, Wait R et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. Proteomics. 2005. 5:4443–4455.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996. 87:3336–3343.

Beecken WD, Engl T, Ringel EM, Camphausen K, Michaelis M, Jonas D, Folkman J, Shing Y, Blaheta RA. An endogenous inhibitor of angiogenesis derived from a transitional cell carcinoma: clipped beta2-glycoprotein-I. Annals of Surgical Oncology. 2006. 13:1241-1251.

Beecken W-DC, Ringel EM, Babica J, Oppermann E, Jonas D, Blaheta RA. Plasmin-clipped b2-glycoprotein-I inhibits endothelial cell growth by down-regulating cyclin A, B and D1 and up-regulating p21 and p27. *Cancer Letters*. 2010. 296:160–167.

Bekhite MM, Finkensieper A, Binas S, Müller J, Wetzker R, Figulla HR, et al. VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2011. 124:1819–1830.

Bellon A, Luchino J, Haigh K, Rougon G, Haigh J, Chauvet S, Mann F. VEGFR2 (KDR/Flk1) signalling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*. 2010. 66:205–219.

Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, Adams RH. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 2009. 137:1124–1135.

Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*. 2005. 7:452-464.

Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. The Transcription Factor MEF2C-Null Mouse Exhibits Complex Vascular Malformations and Reduced Cardiac Expression of Angiopoietin 1 and VEGF. *Developmental Biology*. 1999. 211(2):255-267.

Biasiolo A, Rampazzo P, Brocco T, Barbero F, Rosato A, Pengo V. [Anti-beta 2 glycoprotein I-beta2 glycoprotein I] immune complexes in patients with antiphospholipid syndrome and other autoimmune diseases. *Lupus*. 1999. 8:121-126.

Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*. 2013. 3(1):a006569.

Borensztajn J, Kotlar TJ, Meredith SC. Fractionation of chylomicrons by heparin-sepharose chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985. Baltimore, 260:13047-13052.

Bouma B, Groot PG, Elsen JMH, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink JA, Derkessen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β2-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *The EMBO Journal*. 1999. Heidelberg, 18(19): 5166-5174.

Bray SJ. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Review*. 2006. 7:678–689.

Brighton TA, Chesterman CN. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Baillieres Clinical Haematology*. 1994. Philadelphia, 7:541-547.

Brighton TA, Hogg PJ, Day Y-P, Murray B, Chong BH, Chesterman CN. β2-Glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *British Journal of Haematology*. 1996. Oxford, 93:185-194.

Buttari B, Profumo E, Mattei V, Siracusano A, Ortona E, Margutti P, Salvati B, Riganò R. Oxidized beta2-glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and promotes a T helper type I response. *Blood*. 2005. 106:3880-3887.

Caolo V, van den Akker NM, Verbruggen S, Donners MM, Swennen G, Schulten H, Waltenberger J, Post MJ, Molin DG. Feed-forward signaling by membrane bound ligand receptor circuit: The case of NOTCH-Delta like 4 in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. 285:40681–40689.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996. 380: 435–439.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000. 407:249–257.

Carmeliet P. Angiogenesis in Life, Disease and Medicine. *Nature*. 2005. 438:932–936.

Catalucci D, Condorelli G. Effects of Akt on cardiac myocytes: location counts. *Circulation Research*. 2006. 99:339–341.

Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MV, Pitisci A, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G. Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2007. 14:1060–1062.

Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, Byzova TV. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nature Medicine*. 2005. 11:1188–1196.

Chironi GN, Boulanger CM, Simon A et al. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res*. 2009, 335:143–151.

Chiu W-C, Chiou T-J, Chung M-J, Chiang A-N. $\beta_2$-Glycoprotein I Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis by Suppressing the Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, Akt, and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *PLOS ONE*. 2016. 11(8):e0161950.

Chiu WC, Lin JY, Lee TS, You LR, Chiang AN. b2-Glycoprotein I inhibits VEGF-induced endothelial cell growth and migration via suppressing phosphorylation of VEGFR2, ERK1/2, and Akt. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2013. 372(1-2):9-15.

Chong DC, Koo Y, Xu K, Fu S, Cleaver O. Stepwise arteriovenous fate acquisition during mammalian vasculogenesis. *Developmental Dynamics*. 2011. 240(9):2153-2165.

Claxton S, Fruttiger M. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Expression Patterns*. 2004.5:123–127.

Conti F, Sorice M, Circella A, Alessandri C, Pittoni V, Caronti B, Calderaro C, Griggi T, Misasi R, Valesini G. β2-glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospolipid antibody syndrome and correlates with factor expression. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003. Oxford, 132:509-516.

Cook SA, Matsui T, Li L, Rosenzweig A. Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. 277: 22528–22533.

Courtneidge S, Ralston R, Alitalo K, Bishop JM. Subcellular location of an abundant substrate (p36) for tyrosine-specific protein kinases. *Mol Cell Biol*. 1983. 3:340–350.

Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001. 29:1708–1712.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997. 91:231-241.

De Bock K, De Smet F, Leite De Oliveira R, Anthonis K, Carmeliet P. Endothelial oxygen sensors regulate tumor vessel abnormalization by instructing phalanx endothelial cells. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*. 2009. 87:561–569.

de Graauw M, Tijdens I, Smeets MB, Hensbergen PJ, Deelder AM, van de Water B. Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin activation. *Mol Cell Biol*. 2008. 28:1029–1040.

De Groot PG, Bouma B, Lutters BCH, Simmelink JA, Derksen RH, Gros P. Structure function studies on β2-glycoprotein I. *Journal of Autoimmunity*. 2000. London, 15:87-89.

De Groot PG, Meijers JC. beta(2)-Glycoprotein I: evolution, structure and function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011. 9:1275-1284.

De La Cruz LT. Quantificação de angiogênese em imagens de membrana corioalantóicas de embrião de galinha. 2015. 96p. Dissertação – Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo. 2015.

Dejana E, Tournier-Lasserve E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: Molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*. 2009. 16: 209–221.

Di Marco GS, König M, Stock C, Wiesinger A, Hillebrand U, et al. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. Kidney International. 2013. 83(2):213–222.

Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, Costa L, Henrique D, Rossant J. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & Development*. 2004. 18(20):2474-2478.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 1998. 282:946–949.

Dvorak HF. Angiogenesis: Update 2005. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. 2005. 3:1835–1842.

Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci*. 2001. 114:3155–3166.

Ejaz S, Seok KB, Lim CW. A novel model of image acquisition and processing for holistic quantification of angiogenesis disrupted by application of mainstream and sidestream cigarette smoke solutions. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2006. 21:22–33.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, MooreMW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996. 380: 439–442.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003. 9:669–676.

Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovascular Research*. 2000. 45(3):560-569.

Filipenko NR, Waisman DM. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem*. 2001. 276:5310–5315.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995. 376: 66–70.

Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. 101(45):15949-54.

Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M, Petraglia F, Gotta S, Sardone GL, Matteucci G, et al. Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity. *Circulation Research*. 2010. 106:1839–1125.

Garcia A, Kandel JJ. Notch: A key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histology and Histopathology*. 2012. 27(2):151-156.

Gatne DP, Mungekar S, Addepalli V, Mohanraj K, Ghone SA, Rege NN. Development of collateral vessels: A new paradigm in CAM angiogenesis model. *Microvascular Research*. 2016. 103:11-13.

Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010. 1(12):1170–1177.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*. 2003.161:1163–1177.

Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005. 6:449–461.

Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev*. 2002. 82:331–371.

Gerke V, Weber K. The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J*. 1985. 4:2917–2920.

Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis AS. New insights into the biology and pathobiology of beta2-glycoprotein I. *Current Rheumatology Reports*. 2010. 13:90-95.

Goldsmith GH, Pieranngelli LS, Branch DW, Gharavi AE, Hares EN. Inibition of protrombin activation by antiphospholipids antibodies and β2-glycoprotein I. *British Journal of Haematology*. 1994. Oxford, 87:548-554.

Gomes LF, Alves A, Sevanian A, Peres CA, Cendoroglo MS, Mello-Almada FC, Quirino L, Ramos LR, Junqueira VBC. Role of β2-glycoprotein, LDL, and Antioxidant Levels in Hypercholesterolemic Elderly Subjects. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004. New York, 6:237-244.

Gomes LF, Gonçalves LM, Fonseca FLA, Celli CM, Videla LA, Chaimovich H, Junqueira VBC. Beta2-Glycoprotein I (apolipoprotein H) modulates uptake and endocytosis associated chemiluminescence in rat Kupffer cells. *Free Radical Research*. 2002. 36(7):741-747.

Gude N, Muraski J, Rubio M, Kajstura J, Schaefer E, Anversa P, Sussman MA. Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circulation Research*. 2006. 99:381–388.

Hagihara Y, Enjyoji K, Omasa T, Katakura Y, Suga K, Igarashi M, Matsuura E, Kato H, Yoshimura T, Goto Y. Structure and function of the recombinant fifth domain of humana beta 2-glycoprotein I: effects of specific cleavage between Lys77 and Thr78. *The Journal of Biochemistry*. 1997. 121:128-137.

Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, Dowling K, Chacko J. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem*. 1996. 271:21652–21659.

Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem*. 1994. 269:21191–21197.

Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: A mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med*. 1999. 9:128–138.

Hammel M, Schwarzenbacher R, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Mechanism of the interaction of ß2-GPI with negatively charged phospholipid membranes. *Biochemistry*. 2002. 40:14173-14181.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of theangiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996. 86:353-364.

Harrington LS, Sainson RC,Williams CK, Taylor JM, ShiW, Li JL, Harris AL. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvascular Research*. 2008. 75:144–154.

Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 322:1166–1170.

Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J*. 2006. 25:1816–1826.

Hitchcock JK, Katz AA, Schäfer G. Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. *Journal of Cell Communication and Signaling.* 2014. 8(2):125–133.

Horbach DA, van Oort E, Tempelman MJ, Derksen RHWM, de Groot PG. The prevalence of a non-phospholipid-binding form of β2-glycoprotein I in human plasma – consequences for the development of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998. 80:791-797.

Huenniger K, Kramer A, Soom M, Chang I, Kohler M, Depping R, Kehlenbach RH, Kaether C. Notch 1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010. 67(18):3187-3196.

Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of β2-glycoptotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 1993. 90:2141–2145.

Ichinose A, Bottenus RE, Davie EW. Structure of transglutaminases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990. 265:13411-13414.

Ioannou Y, Zhang JY, Passam FH, Rahgozar S, Qi JC, Giannakopoulos B, Qi M, Yu P, Yu DM, Hogg PJ, Krilis SA. Naturally occurring free thiols within b2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells and regulation of oxidative stress induced cell injury. *Blood*. 2010. 116:1961-1970.

Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental Cell*. 2009.16:222–231.

Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signalling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2003. 194: 237–255.

Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M,Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. 2003. 130: 5281–5290.

Jacovina AT, Deora AB, Ling Q, Broekman MJ, Almeida D, Greenberg CB, Marcus AJ, Smith JD, Hajjar KA: Homocysteine inhibits neoangiogenesis in mice through blockade of annexin A2-dependent fibrinolysis. *J Clin Invest*. 2009. 119:3384–3394.

Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology*. 2010. 12: 943–953.

Kaczan-Bourgois D, Salles JP, Hullin F, Fauvel J, Moisand A, Duga-Neulat I, et al. Increased content of annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta*, 1996. 17:669–676.

Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, Zackson S, Toba M, Shinomiya A, Waisman DM. The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem*. 1998. 273:4790–4799.

Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I, Gunn A, Nakagawa Y, Shimano H, Todorov I, Rossi JJ, Natarajan R. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature Cell Biology*. 2009. 11:881–889.

Kim BR, Seo SH, Park MS, Lee SH, Kwon Y, Rho SB. sMEK1 inhibits endothelial cell proliferation by attenuating VEGFR2-dependent Akt/eNOS/HIF-1α signaling pathways. Oncotarget. 2015. 6:31830–31843.

Kimble J, Simpson P. The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997. 13:333-61.

Koch S, Donarski N, Goetze K, Kreckel M, Stuerenburg HJ, Buhmann C, Beisiegel U. Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Lipid Research*. 2001. Bethesda, 42:1143-1151.

Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009. 137(2):216-133.

Kovall RA. Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together and active transcription complex. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007. 17(1):117-127.

Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & Development*. 2004. 18(20):2469-73.

Laplaud PM, Bauchart D, Durand D, Beaubatie L, Chapman MJ. Intestinal lymph and plasma lipoproteins in the preruminant calf: partial resolution of particle heterogeneity in the 1.040-1.090 g/ml interval. *Journal of Lipid Research*. 1991. Bethesda, 32:1429-1439.

Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*. 2001. 128(19):3675-3683.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica. 3a. ed, São Paulo-SP: Savier, 2002.

Li Q, Ke F, Zhang W, Laumonnier Y, Syrovets T, Simmet T, et al. A role for the annexin A2 amino-terminal peptide in the plasmin-induced activation of human peripheral monocytes. *Mol Immunol*. 2010. 47:2405–2410.

Li Q, Laumonnier Y, Syrovets T, Simmet T. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 27:1383–1389.

Lima e Silva R, Shen J, Gong YY et al. Agents that bind annexin A2 suppress ocular neovascularization. *J Cell Physiol*. 2010. 225:855–864.

Lin KY, Pan JP, Yang DL, Huang KT, Chang MS, Ding PY, Chiang NA. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sciences*. 2001. 69:707–719.

Lin KY, Wang HH, Lai ST, Pan JP, Chiang NA. Beta(2)-glycoprotein I protects J774A.1 macrophages and human coronary artery smooth muscle cells against apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005. 94:485–496.

Ling Q, Jacovina AT, Deora A et al. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2004. 113:38–48.

Liu J, Rothermund CA, Ayala-Sanmartin J, Vishwanatha JK. Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleocytoplasmic shuttling of annexin II. BMC Biochem. 2003. 4:10.

Liu L, Zhao L, Long Y, Kuang G, Fieguth P. Extended local binary patterns for texture classification. *Image and Vision Computing*. 2012. 30:86-99.

Lozier J, Takahash N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma ß2-glycoprotein I. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 1984. 81:3640-3644.

Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*. 2004. 432: 179–186.

Luo W, Yan G, Li L, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mediates serine 25 phosphorylation and nuclear entry of annexin A2 via PI-PLC-PKCalpha/PKCbeta pathway. *Mol Carcinog*. 2008. 47:934–946.

Lutters BCH, Derksen RHWM, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, De Groot PG. Dimers of β2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and apolipoprotein E receptor 2'. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278:33831-33838.

Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, Mccrae KR. High affinity binding of β2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275:15541-15548.

Machado C, Nicot ME, Stella CN, Vaz S, Prado C, Maria DA, Fernandez FP, Gomes LF. Digital image processing assessment of the differential in vitro antiangiogenic effects of dimeric and monomeric beta2-glycoprotein I. *Journal of Cytology & Histology*. 2013. 4:187.

Machine Vision Group. Texture analysis with local binary patterns. University of Oulu [Internet]. [20--]. Disponível em: http://www.ee.oulu.fi/mvg

Madeddu P, Kraenkel N, Barcelos LS, Siragusa M, Campagnolo P, Oikawa A, Caporali A, Herman A, Azzolino O, Barberis L, Perino A, Damilano F, Emanueli C, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008. 28:68–76.

Madureira PA, Hill R, Lee PW, Waisman DM. Genotoxic agents promote the nuclear accumulation of annexin A2: Role of annexin A2 in mitigating DNA damage. *PLOS ONE*. 2012. 7:e505912012.

Madureira PA, Hill R, Miller VA, Giacomantonio C, Lee PW, Waisman DM. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis. *Oncotarget*. 2011. 2:1075–1093.

Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Slupianek A, Reiss K, Trotta R, Calabretta B, Skorski T. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Research*. 1999. 59:2815-2819.

Makanya NA, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V. Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. 2016. PLOS ONE. 11(4):e0152821.

Marme D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis. *Immunology Ocular Tumors*. Taylor & Francis; Oxfordshire, United Kingdom. 2002. 61-71.

Matschke K, Silva-Azevedo, L, Hlushchuk R, Djonov V, Baum O. Annexins as cell-type-specific markers in the developing chicken chorionallantoic membrane. *Cell Tissue Res*. 2006. 323:395–404.

Mehdi H, Aston CE, Sangueira DK, Hamman RF, Kamboh MI. Genetic variation in the apolipoprotein H (β2-glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. Human Genetics. 1999. Berlin, 105:63-71.

Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J Exp Zool*. 2002. 292:241–254.

Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. 289:H1106–H1114.

Miyakis S, Robertson S, Krilis S. Beta 2 glycoprotein I and its role in the antiphospholipid syndrome-lessons from knockout mice. *Clinical Immunology*. 2004. 112:136-43.

Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Leheste J-R, Christensen EI, Willnow TE. Beta-2 glycoprotein I (Apolipoprotein H) and Beta-2 glycoprotein I-phospolipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998. 102:902-909.

Morel E, Gruenberg J. Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009. 284:1604–1611.

Morel E, Parton RG, Gruenberg J. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell*. 2009. 16:445–457.

Mukai Y, Rikitake Y, Shiojima I, Wolfrum S, Satoh M, Takeshita K, Hiroi Y, Salomone S, Kim HH, Benjamin LE, Walsh K, Liao JK. Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *Journal of Clinical Investigation*. 2006. 116:334–343.

Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. *Cancer Research*. 2010. 70: 8211–8221.

Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, et al. Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine*. 2007. 13:1467–1475.

Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked {beta}2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its anti-angiogenic property. *Blood*. 2009. 114:2553-2559.

Narbaitz R, Bastani B, Galvin NJ, Kapal VK, Levine DZ. Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H+-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoicmembrane. *Journal of Anatomy*. 1995. 186(2):245–252.

Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival fator of cardiomyocytes: mitochondrial as a target of 5-HT2B receptor signaling. *FASEB Journal*. 2003. 17:1373-1375.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002. 14(5):381-395.

Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*. 2006. 444: 1032–1037.

Ohkura N, Hagihara Y, Yoshimura T, Goto Y, Kato H. Plasmin can reduce the function of human beta 2-glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form. *Blood*. 1998. 91(11):4173-4179.

Ojala T, Pietikäinen M, Harwood D. A comparative study of texture measures with classification based on featured distributions. *Pattern Recognition*. 1996. 29(1):51-59.

Ojala T, Pietikäinen M, Mäenpää. Gray scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *Lect. Notes Comput. Sci.* 2000. 1842: 404–420.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling - In control of vascular function. *Nature Review*. 2006. 7:359–371.

Orcy RB, Schroeder S, Martins-Costa SH, Ramos JG, Schechinger W, Klein H, Brum IS, von Eye Corleta H, Capp E. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2008. 66:231-236.

Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, Walsh K. Follistatinlike 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008. 283:32802–32811.

Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Reviews*. 2011. 25(2):83-90.

Passam FH, Qi JC, Tanaka K, Matthaei KI, Krilis SA. In vivo modulation of angiogenesis by beta 2 glycoprotein I. *Journal of Autoimmunity*. 2010b. 35:232-240.

Passam FH, Rahgozar S, Qi M, Raftery MJ,Wong JWH, Tanaka K, Ioannou Y, Zhang JY, Gemmell R, Qi JC, Giannakopoulos B, Hughes WE, Hogg PJ, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I is a substrate of thiol oxidoreductases. *Blood*. 2010a. 116:1995-1997.

Patenaude A, Fuller M, Chang L, Wong F, Paliouras G, Shaw R, Kyle AH, Umla ndt P, Baker JHE, Diaz E , Tong J, Minchinton AI, Karsan A. Endothelial-Specific Notch Blockade Inhibits Vascular Function and Tumor Growth through an eNOS-Dependent Mechanism. Cancer Research. 2014. 74(9):2402-2411.

Pennings MTT, Van Lummel M, Derksen RHWM, Urbanus RT, Romijn RA, Lenting PJ, De Groot PG. Interaction of β2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006. 4:1680-1690.

Pereira-Lopes JEF. Efeito antiangiogênico do metil jasmonato, puro ou nanocarreado, um novo mecanismo para sua ação antineoplásica e antimetastática. 2009. 266p. Tese – Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo. 2009.

Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell*. 2009. 16(2):196-208.

Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, et al. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Developmental Cell*. 2009. 16:70–82.

Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, Eyiah-Mensah G, Riveros M, Perruzzi C, Sun J, Monahan-Earley RA, Shiojima I, Nagy JA, et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell*. 2006. 10:159–170.

Polz E, Wurm H, Kostner GM. Investigations on ß2-glycoprotein I in the rat: isolation form serum and demonstration in lipoprotein density fractions. *International Journal of Biochemistry*. 1980. 11: 265-570.

Rahgozar S. Revising Beta 2 Glycoprotein I, the Major Autoantigen in the Antipholipid Syndrome. *Iranian Journal of Immunology*. 2012. 9(2):73-85.

Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, Lambert V, Foidart JM, Noël A. Role of plasminogen activatoreplasmin system in tumor angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003. 60:463-473.

Ramachandran P, Boontheung P, Pang E, Yan W, Wong DT, Loo JA. Comparison of N-linked glycoproteins in human whole saliva, parotid, submandibular, and sublingual glandular secretions identified using hydrazile chemistry and mass spectrometry. *Clinical Proteomics*. 2008. 4:80-104.

Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Paul Solomon FD. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*. 2015. 230(1):16-26.

Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. 99(14):9248-9253.

Rescher U, Gerke V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*. 2004. 117:2631–2639.

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record*. 2001. 264:317–324.

Ribatti D, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, Presta M. Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Developmental Biology*. 1995. 170:39–49.

Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. 1996. 40:1189–1197.

Richardson MR, Price MO, Price FW, Pardo JC, Grandin JC, You J, Wang M, Yoder MC. Proteomic analysis of human aqueous humor using multidimensional protein identification technology. *Molecular vision*. 2009. 15:2740-50.

Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*. 2006. 444:1083–1087.

Rocha SCF. The role of multiple DSL, ligands - D111, D114 and Jag1 – in vertebrate neurogenesis. 2009. Tese – Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. 2009

Sakai T, Balasubramanian K, Maiti S, Halder JB, Schroit AJ. Plasmin-cleaved beta-2-glycoprotein 1 is an inhibitor of angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 2007. 171:1659-1669.

Sanguera DK, Kristensen T, Hamman RF, Kamboh MI. Molecular basis of the apolipoprotein H (β2-glycoprotein I) protein polimorfism. *Human Genetics*. 1997a. Berlin, 100:57-62.

Sanguera DK, Wagenkenecht DR, McIntyre JA, Kamboh MI. Identification of structural mutations in fifith domain of apolipoprotein H which affect phospholipid binding. *Human Molecular Genetics*. 1997b. Oxford, 6:311-316.

Scehnet JS, Jiang W, Kumar SR, Krasnoperov V, Trindade A, Benedito R, Djokovic D, Borges C, Ley EJ, Duarte A, et al. Inhibition of Dll4-mediated signalling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*. 2007. 109: 4753–4760.

Schiekofer S, Belisle K, Galasso G, Schneider JG, Boehm BO, Burster T, Schmitz G, Walsh K. Angiogenic-regulatory network revealed by molecular profiling heart tissue following Akt1 induction in endothelial cells. *Angiogenesis*. 2008. 11: 289–299.

Schlatter P, Konig MF, Karlsson LM, Burri PH. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvasc Res*. 1997. 54(1):65–73.

Schousboe I, Rasmussen MS. The effect of β2-glycoprotein I on the dextran sulfate and sulfatide activation of the contact system (Hageman factor system) in the blood coagulation. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1988. Oxford, 20:787-792.

Schultze HE, Heide H, Haupt H. Ube rem bischer unbekanntes niedermolekulares/ 32-Globulin des Humanserums. *Natuwissenschaften*. 1961, 48.

Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Crystal structure of human β2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *The EMBO Journal*. 1999. Heidelberg, 18(22):6228-6239.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M,Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995. 376:62–66.

Sharma M, Ownbey RT, Sharma MC. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol*. 2010. 88:278–286.

Sharma MC, Sharma M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des*. 2007. 13:3568–3575.

Sheng Y, Sali A, Herzog H, Lahnstein J, Krilis SA. Site-directed mutagenesis of recombinant beta 2-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. *The Journal of Immunology*. 1996. 157:3744-3751.

Shi RZ, Wang JC, Huang SH, Wang XJ, Li QP. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*. 2009. 315:10–15.

Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes & Development*. 2006. 20:3347–3365.

Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Torella D, Nurzynska D, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Sussman MA. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circulation Research*. 2004. 94:884–891.

Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 2007. 445:781–784.

Siemerink MJ, Klaassen I, Van Noorden CJF, Schlingemann Ro. Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2013. 61:101–115.

Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012. 15:151–163.

Silva CHTP, Leopoldino AM, Silva EHT, Taft CA. Cancer: From angiogenesis to chemotherapy. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2005. 23-39.

Simó R, Higuera M, Garcia-Ramirez M, Canals F, Garcia-Arumi J, Hernandez C. Elevation of apolipoprotein A-I and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients. *Archives of Ophthalmology*. 2008. 126(8):1076–1081.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005. 9:59-71.

Stahl M, Ge C, Shi S, Pestell RG, Stanley P. Notch1-induced transformation of RKE-1 cells requires up-regulation of cyclin D1. *Cancer Research*. 2006. 66(15):7562-7570.

Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, Sim RB, Day AJ. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human β2-glycoprotein I. *The Biochemical Journal*. 1991. 277:387-391.

Stella CN, Gomes LF. (2013) Monoclonal antibodies anti-beta2-glycoprotein I: production, characterization, analytical applications. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken. 2013. ISBN: 978-3-659-39385-3

Su SC, Maxwell SA, Bayless KJ. Annexin 2 regulates endothelial morphogenesis by controlling AKT activation and junctional integrity. *J Biol Chem*. 2010. 285:40624–40634.

Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. 104:3225–3230.

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cell in focus: endotelial cell. *The Internacional Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2002. 34:1508-1512.

Swisher JF, Burton N, Bacot SM, Vogel SN, Feldman GM. Annexin A2 tetramer activates human and murine macrophages through TLR4. *Blood*. 2010. 115:549–558.

Swisher JF, Khatri U, Feldman GM. Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2007. 82:1174–1184.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science (London)*. 2005. 109:227–241.

Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Takeya H, Yasuda S, Ichikawa K, Tsutsumi A, Suzuki K, Koike T. Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with beta(2)-glycoprotein I deficiency. *Blood*. 2000. 96:1594–1595.

Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco CA, Murtomaki A, Aranda E, et al. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nature Cell* Biology. 2011. 13:1202–1291.

Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008.454: 656–660.

Tanaka K, Yamaguchi S, Sawano A, Shibuya M. Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Japanese Journal of Cancer Research*. 1997. 88:867–876.

Tang J, Wang J, Kong X, Yang J, Guo L, Zheng F, Zhang L, Huang Y, Wan Y. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway. *Experimental Cell Research*. 2009. 315:3521–3531.

Tong Q, Qing Y, Wu Y, Hu X, Jiang L, Wu X. Dioscin inhibits colon tumor growth and tumor angiogenesis through regulating VEGFR2 and AKT/MAPK signaling pathways. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;281: 166–173.

Tsujita Y, Muraski J, Shiraishi I, Kato T, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103:11946–11951.

Valapala M, Thamake SI, Vishwanatha JK. A competitive hexapeptide inhibitor of annexin A2 prevents hypoxia-induced angiogenic events. *J Cell Sci.* 2011. 124:1453–1464.

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A et al. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003. 59: 277–287.

Vinci M, Gowan S, Boxall B, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D, Eccles AS. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012. 10:29.

Waisman DM. Annexin II tetramer: Structure and function. *Mol Cell Biochem*. 1995.149–150:301–322.

Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, Schlingemann RO. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *Journal of Pathology*. 2001. 195:490–497.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal Eye Research*. 2003. 22:1–29.

Wythe JD, Dang LT, Devine WP, Boudreau E, Artap ST, He D, Schachterle W, Stainier DY, Oettgen P, Black BL, Bruneau BG, Fish JE. ETS factors regulate Vegf-dependent arterial specification. *Development & Cell*. 2013. 26(1):45-58.

Yamada A, Irie K, Hirota T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y. Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2005. 280:6016–6027.

Yamashita, AS. Ativação da via de sinalização Notch pelos oncogenes RET/PTC e BRAFT1799A no carcinoma papilífero de tireoide e sua influência na diferenciação e proliferação celular. 2013. 82p. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2013

Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y, Su B. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nature Genetics*. 2000. 24(3):309-313.

Yasuda S, Tsutsumi A, Chiba H, Yanai H, Miyoshi Y, Takeuchi R, Horita T, Atsumi T, Ichikawa K, Matsuura E, Koike T. β2-glycoprotein I deficiency: prevalence, geletic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis*. 2000. Amsterdam, 152:337-346.

Yu P, Passam FH, Yu DM, Denyer G, Krilis AS. Beta2-glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008. 6:1215-1223.

Zhang LQ, Zhou F, Han WC, Shen B, Luo JC, Shibuya M, He YL. VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell Research*. 2010. 20:1319–1331.

Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, Quigley JP. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Research*. 2002. 62:7083–7092.

# 8. ANEXOS

## 8.1. Anexo A – Imagens originais das culturas 3D

As imagens aqui apresentadas representam as imagens originais, sem padronização do fundo e tratamento em escalas de cinza, referentes às Figura 10 e Figura 11 apresentadas no texto.

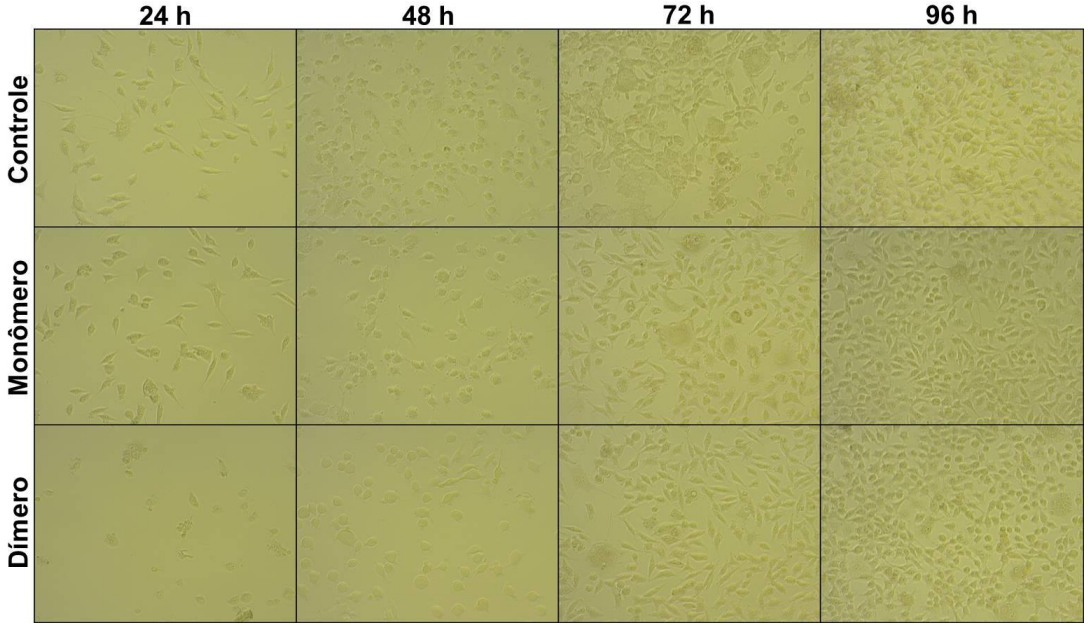


**Figura 23.** Imagem original - Efeito de $\beta_2$GPI sobre o crescimento e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em baixa confluência. Substrato: Matrigel®; inoculo inicial: $5x10^3$ células/poço; Meio: RPMI sem suplementação de SFB.

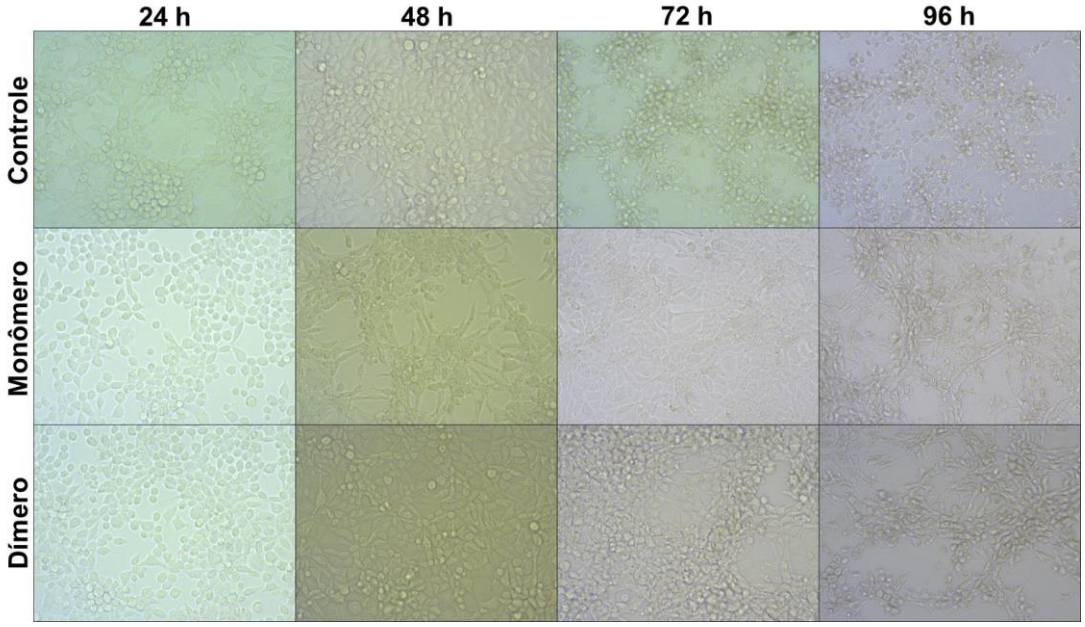


**Figura 24**. Imagem original - Efeito de $\beta_2$GPI sobre o crescimento e a diferenciação de HUVECs em cultura 3D em semi confluência. Substrato: Matrigel®; inóculo inicial: $1x0^5$ células/poço; Meio: RPMI sem suplementação de SFB.

## 8.2. Anexo B – Tabela de controle de umidade e temperatura medido pelo módulo Arduino

**Tabela 3.** Exemplo de dados de controle de temperatura e umidade do interior da chocadeira, no período de uma hora, obtidos durante o processo de experimentação

| Hora | Minuto | Umidade (%) | Temperatura (ºC) |
|---|---|---|---|
| 8 | 0 | 41,97 | 37,78 |
| 8 | 1 | 41,25 | 37,71 |
| 8 | 2 | 41,58 | 37,74 |
| 8 | 3 | 41,29 | 37,72 |
| 8 | 4 | 41,43 | 37,72 |
| 8 | 5 | 41,47 | 37,77 |
| 8 | 6 | 41,28 | 37,71 |
| 8 | 7 | 41,58 | 37,74 |
| 8 | 8 | 41,33 | 37,73 |
| 8 | 9 | 41,42 | 37,72 |
| 8 | 10 | 41,45 | 37,77 |
| 8 | 11 | 41,28 | 37,72 |
| 8 | 12 | 41,55 | 37,75 |
| 8 | 13 | 41,36 | 37,73 |
| 8 | 14 | 41,47 | 37,73 |
| 8 | 15 | 41,37 | 37,75 |
| 8 | 16 | 41,27 | 37,71 |
| 8 | 17 | 41,60 | 37,75 |
| 8 | 18 | 41,34 | 37,73 |
| 8 | 19 | 41,49 | 37,73 |
| 8 | 20 | 41,38 | 37,73 |
| 8 | 21 | 41,28 | 37,71 |
| 8 | 22 | 41,52 | 37,74 |
| 8 | 23 | 41,32 | 37,72 |
| 8 | 24 | 41,57 | 37,74 |
| 8 | 25 | 41,41 | 37,73 |
| 8 | 26 | 41,42 | 37,72 |
| 8 | 27 | 41,42 | 37,74 |
| 8 | 28 | 41,28 | 37,7 |
| 8 | 29 | 41,56 | 37,74 |
| 8 | 30 | 41,30 | 37,72 |
| 8 | 31 | 41,57 | 37,73 |
| 8 | 32 | 41,40 | 37,74 |
| 8 | 33 | 41,33 | 37,72 |
| 8 | 34 | 41,48 | 37,73 |
| 8 | 35 | 41,30 | 37,73 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 8 | 36 | 41,58 | 37,72 |
| 8 | 37 | 41,38 | 37,73 |
| 8 | 38 | 41,35 | 37,72 |
| 8 | 39 | 41,47 | 37,77 |
| 8 | 40 | 41,33 | 37,72 |
| 8 | 41 | 41,59 | 37,74 |
| 8 | 42 | 41,37 | 37,73 |
| 8 | 43 | 41,42 | 37,72 |
| 8 | 44 | 41,45 | 37,78 |
| 8 | 45 | 41,29 | 37,72 |
| 8 | 46 | 41,56 | 37,75 |
| 8 | 47 | 41,30 | 37,72 |
| 8 | 48 | 41,54 | 37,73 |
| 8 | 49 | 41,38 | 37,73 |
| 8 | 50 | 41,34 | 37,72 |
| 8 | 51 | 41,55 | 37,77 |
| 8 | 52 | 41,35 | 37,72 |
| 8 | 53 | 41,58 | 37,75 |
| 8 | 54 | 41,42 | 37,75 |
| 8 | 55 | 41,43 | 37,72 |
| 8 | 56 | 41,42 | 37,76 |
| 8 | 57 | 41,32 | 37,72 |
| 8 | 58 | 41,54 | 37,75 |
| 8 | 59 | 41,31 | 37,73 |
| 9 | 0 | 41,50 | 37,72 |

## 8.3. Anexo C – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

MEDICINA
USP
CEUA-FMUSP

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/12/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 529/13 intitulado: "**Estudo do Efeito da Beta2-Glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha**", apresentado pelo **Programa de Fisiopatologia Experimental.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Durvanei Augusto Maria**
**Pesquisador (a) Executante: Camila Machado**

**CEP-FMUSP, 10 de Dezembro de 2013.**

**Dr. Eduardo Pompeu**
**Coordenador**
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

**Prof. Dr. Roger Chammas**
**Coordenador**
**Coordenadoria de Ética em Pesquisa**

CEUA-FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

# CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo do efeito da beta2-Glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha", **protocolo nº 1124/13**, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Camila Machado - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 9/11/2013.

| **Vigência do Projeto:** 10/2013 - 10/2015 | **N° de animais/espécie** |
|---|---|
| Laboratório de Bioquímica e Biofísica | 63 ovos embrionados de galinha (M,F) |

São Paulo, 9 de outubro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB