BIBLIUTECA

Faculdade de Cièncias Farmacêuticas Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Neoangiogênese na aterosclerose: modulação por lípides nitrados.

Martina Rudnicki

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo 2009 DEDALUS - Acervo - CQ

30100015694

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rudnicki, Martina

R916n : Neoangiogênese na aterosclerose ; modulação por lípides nitrados : Martina Rudnicki, -- São Paulo, 2009. 134p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Lipídio : Bioquímica humana 2. Óxído nítrico : Bioquímica humana I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

612.01577 CDD

BIBLIOTECA

Faculdade de Ciências Farmacéuticas Universidade de São Paulo

Martina Rudnicki

Neoangiogênese na aterosclerose: modulação por lípides nitrados

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

Orientadora
1°. examinador
2°. examinador
3°. examinador
4°. examinador

São Paulo, de	
---------------	--

Agradecimentos

Após esta interessante, difícil, excitante, exaustiva, trabalhosa e também muitas vezes frustrante jornada de 4 anos de doutorado, eu gostaria de agradecer várias pessoas por terem estado comigo e me apoiado de diferentes maneiras durante este tempo.

Inicialmente, eu gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra Dulcineia S.P. Abdalla por ter me propiciado tudo aquilo que foi necessário para o desenvolvimento desta tese e de minha formação pessoal. Obrigada por tudo!

Meu muito obrigado ao Herr Prof Dr Brüne, por ter tornado possível a realização do doutorado-sanduíche, pela confiança, incentivo, conversas no Strassenbahn ao final do dia que sempre faziam eu recuperar meu ânimo e ver meus resultados de modo diferente. Vielen Dank!

A Profa. Dra Chao Yun Irene Yan pela ajuda na padronização do modelo *in vivo* utilizado nesse trabalho.

Ao Prof Dr. José E. Krieger pelo auxílio na parte de expressão gênica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) pelo apoio financeiro que tornaram possível a execução deste trabalho.

Obrigada ao Prof. Dr João Gustavo P. Amarante-Mendes e seu aluno Dr. Ricardo Weinlich pelo auxilio na realização dos experimentos de proliferação celular;

Obrigada a todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Bioquímica Clinica da USP: Andréia, Cris, Tanize, Elaine, Fernanda, Carol, Soraya, Léo, Laila, Carol Marinho, Tamara, Vanessa, Simone, Evellyne, Lu, Alejandro e Júlio pelo apoio, amizade e discussões e por terem tornado atualmente o lab um local tão agradável para trabalhar.

Em especial, à Luciane, minha colega de laboratório e que se tornou irmã de coração, que me ajudou no desenvolvimento desse projeto, me apoiou, me fez rir e chorar e também riu e chorou comigo. E ao Júlio, por toda ajuda, em particular, enquanto estive na Alemanha, por todas as contribuições ao trabalho e às revisões.

Às gurias da hemato, obrigada Amanda, Mariana e Karina, por todos os empréstimos, ajudas, conselhos, ouvidos, cafés, críticas, brincadeiras, grupos de apoio, sugestões, valeu mesmo, vocês fizeram o doutorado se tornar mais divertido;

À Daniela Jardim pelo auxilio nos experimentos de avaliação gênica;

Ao Felipe A. Dörr e à Daniela M.L. de Paula à ajuda nas avaliações de espectrometria de massa;

Ao Dr. Dmitry Namgalaze e a Dra Nathalie Dehne, meus conselheiros europeus, por todas as discussões e por todos os ensinamentos;

À todos os membros do "hypoxia"-lab: Barbarra Herr, Christian Werno, Heidi Menrad e Dr. Jie Zhou por todas as discussões, auxílio nas execuções e esclarecimentos;

Obrigada Olga, Anja, Virginie, Daniel e Karla vocês fizeram minha estada em Frankfurt ser muito prazerosa e especial;

Obrigada Kirstin por toda assistência em Frankfurt;

Além disso, eu gostaria de agradecer à minha família por sempre me apoiarem em minha carreira e em todos os aspectos da minha vida: meus pais por sempre acreditarem em mim, especialmente em momentos em que nem eu acreditava. Minha irmã Andréia, e meus sobrinhos Eduardo e Valentina, pela paciência, por entender minha ausência e minha distância em certos momentos. Obrigada, vocês me ajudaram a me tornar a pessoa que eu sou hoje;

Por último, mas definitivamente não menos importante, eu gostaria de agradecer a pessoa mais importante da minha vida. Sem você, esse doutorado não teria sido possível. Muito obrigada Tiago, por sempre ter me apoiado, me aconselhado e me suportado durante esses 7 anos e meio. Obrigada por ser a luz que me guia, a minha força e a esperança que me mantém acreditando. Obrigada por toda paciência, pelas revisões, pelo carinho e principalmente por sempre me fazer acreditar "que vai dar tudo certo".



Resumo

Rudnicki M. Neoangiogênese na aterosclerose: modulação por lípides nitrados. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2009.

Lípides nitrados (NO2-FA) são apontados como uma nova classe de mediadores lipídicos, podendo atuar como reservatórios endógenos de óxido nítrico ('NO) bem como moduladores pluripotentes de sinalização celular. Recentemente, tem sido sugerido que os doadores de NO estariam envolvidos na regulação da angiogênese. Evidências contundentes indicam ainda que o processo de neovascularização poderia contribuir para a patogênese de uma serie de condições clínicas, entre elas a aterosclerose. Contudo, apesar de diversos estudos terem explorado os efeitos biológicos dos NO₂-FA, os efeitos destes compostos sobre o processo de angiogênese não haviam sido descritos. Dessa maneira, o presente trabalho investigou os efeitos dos NO₂-FA (derivados da nitração do ácido linoléico e oléico) no processo de angiogênese. Demonstrou-se que os NO₂-FA podem atuar como mediadores pró-angiogênicos. Este efeito foi caracterizado em células endoteliais humanas, assim como, em modelos ex vivo e in vivo. Nas células endoteliais, observou-se que os NO2-FA não influenciaram a proliferação ou a viabilidade celular, ao passo que estimularam a migração. Demonstrou-se também que os NO2-FA podem modular o brotamento ex vivo de novos vasos, em cultura de anéis de aorta de rato, bem como o processo angiogênico in vivo observado na membrana corioalantóica de embrião de galinha. Adicionalmente, os NO₂-FA induziram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é o principal mediador do processo de angiogênese. Em relação ao mecanismo de ação, os achados sugerem que os efeitos demonstrados seriam via mecanismos dependentes de 'NO, uma vez que foram abolidos na presença de um següestrador de 'NO, enquanto concentrações equivalentes dos lípides precursores não demonstraram qualquer influência nas condições experimentais utilizadas neste estudo. Por fim, os efeitos pró-angiogênicos/ dos NO₂-FA foram mediados pela estabilização da proteína do fator induzível por hipóxia -1α (HIF-1α), uma vez que estes compostos promoveram acúmulo desta proteína e falharam em demonstrar efeitos indutores em células knockdown para o gene HIF-1α. Em conjunto, estes resultados indicam que os NO2-FA podem modular a migração de células endoteliais e estimular o processo de angiogênese resultante da ativação de HIF-1α via mecanismo dependente de NO.

Palavras chaves: lípides nitrados, angiogênese, migração, HIF- 1α - fator induzível por hipóxia - 1α , doadores de *NO.

Abstract

Rudnicki M. Neoangiogenesis in atherosclerosis: modulation through nitrated lipids [PhD Thesis]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2009.

Nitrated lipids (NO2-FA) are described as a new class of lipid mediators that are able to act as endogenously nitric oxide (*NO) reservoirs as well as pluripotent cell signaling modulators. Furthermore, recent findings suggest that *NO donors could be involved in the regulation of angiogenesis. Compelling evidence also indicate that the neovascularization process might contribute to the pathogenesis of many clinical conditions, such as atherosclerosis. However, although several studies have explored the NO₂-FA biological properties, the effects of these compounds on the angiogenic process remain unknown. Hence, the present study investigated the effects of the NO₂-FA (derivates from the nitration of linoleic and oleic acids at physiological concentrations) on angiogenesis process. It is demonstrated that the NO₂-FA could act as pro-angiogenic mediators. This effect was observed not only in human endothelial cells but also in ex vivo and in vivo models. Using endothelial cells, it is showed that NO₂-FA failed to affect cell proliferation or influence cellular viability, but significantly stimulated cell migration. It was also found that the NO2-FA might modulate the ex vivo sprouting of new vessels as well as the in vivo angiogenic process, while inducing the expression of the vascular endothelial growth factor, the main mediator of angiogenesis. The data are consistent with the hypothesis that the observed effects mediated by NO-dependent mechanisms, since the presence of a 'NO scavenger abrogated the induced effects, whereas equimolar concentrations of its precursors, showed no effect on angiogenesis under our experimental conditions. Finally, the pro-angiogenic effects of NO₂-FA were mediated by the stabilization of the hypoxia inducible factor- 1α (HIF- 1α) protein, because these compounds increased the protein amount and failed to show inductive effects in HIF-1 α knockdown cells. Taken together, these findings indicated that NO₂-FA might modulate the endothelial cell migration and stimulate the process of angiogenesis by the HIF-1 α induction through a 'NO-dependent mechanism.

Keywords: nitrated lipids, angiogenesis, migration, HIF-1 α - hypoxia inducible factor-1 α , *NO donors.

Lista de ilustrações e tabelas

Figura 1. O processo de angiogênese	22
Figura 2. Estruturas químicas de NO ₂ -Fas	33
Figura 3. Espectro de massa dos produtos de reação entre LA e NO₂BF₄	56
Figura 4. Espectro de massa de um pico resolvido por HPLC e analisado por	
LC/ESI/MS	57
Figura 5. Caracterização por LC/ESI/MS do LNO ₂	57
Figura 6. Efeitos do tratamento de LNO ₂ , LA, OA, OANO ₂ ou etanol na viabilidade	
celular	59
Figura 7. Análise da proliferação celular com marcação com CFSE	61
Figura 8. Cinética da proliferação de células endoteliais marcadas com CFSE	61
Figura 9. NO₂-FA induzem migração endotelial celular	63
Figura 10. Efeito do tratamento com LA e LNO₂ sobre a migração celular de células	
endoteliais	64
Figura 11. Efeito do tratamento com OA e OANO ₂ sobre a migração celular de células	
endoteliais	64
Figura 12. Efeito do pré-tratamento com c-PTIO (100 μM) sobre a migração celular	
induzida por LNO $_2$ 10 μ M e OANO $_2$ 10 μ M	66
Figura 13. Efeito do pré-tratamento com L-NMMA (500 μM) na migração celular	
induzida por LNO ₂ (1-10 μM)	67
Figura 14. LNO ₂ estimula angiogênese <i>ex vivo</i>	68
Figura 15. Os efeitos de LNO ₂ sobre o processo angiogênico são independentes de	
sua molécula precursora	69
Figura 16. OANO ₂ estimula angiogênese <i>ex vivo</i>	70
Figura 17. O pré-tratamento com c-PTIO (100 μM) inibe o brotamento de novos vasos	
induzido por LNO $_2$ 10 μM e OANO $_2$ 10 μM	71
Figura 18. O pré-tratamento com L-NMMA (500 μM) também inibe o brotamento de	
novos vasos induzido por LNO ₂ 1 e 10 μM	71
Figura 19. Fotos representativas de anéis aórticos	72
Figura 20. Lipides nitrados estimulam a neovascularização em modelo <i>in vivo</i>	74
Figura 21. NO ₂ -FA induzem a expressão de VEGF	78
Figura 22. NO ₂ -FA induzem a expressão de VEGF e VEGFR1	79
Figura 23. NO ₂ -FA induzem a expressão de VEGF em células endoteliais HUVEC via	
mecanismo dependente de 'NO	80

Figura 24. LNO ₂ 10 μM induz a expressão de proteínas pró-angiogênicas	82
Figura 25. LNO ₂ 10 μM inibe a expressão de proteínas anti-angiogênicas	83
Figura 26. Efeitos dos NO ₂ -FA sobre a secreção de VEGF em meio de cultura	84
Figura 27. LNO $_2$ 10 μ M induz um aumento na atividade de MMP9	85
Figura 28. LNO $_2$ 10 μ M induz um aumento na atividade de MMP9 via mecanismo	
dependente de 'NO	85
Figura 29. NO_2 -FA induzem o acúmulo de RNAm e da proteína de HIF-1 $lpha$ em	
EA.hy926	89
Figura 30. NO_2 -FA induzem o acúmulo de RNAm e proteína de HIF-1 α em HUVEC	90
Figura 31. Caracterização de células <i>knockdown</i> para o gene HIF-1α	92
Figura 32. A migração celular induzida por NO_2 -FA é mediada por HIF- 1α	94
Figura 33. O efeito dos NO_2 -FA sobre a expressão de VEGF é mediado por HIF-1 α	95
Tabela 1. Seqüência de primers utilizados	50

Lista de abreviaturas

AP-1 Ativador 1 de proteína AANO₂ Nitroaraquidonato

CAM Membrana corioalantóica

c-PTIO 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido

CD36 Receptor de trombospondina

CFSE Diacetato de carboxi-fluoresceína, succinimidil Ester

DII4 Ligante delta-4
DMSO Dimetilsulfóxido

EGF Fator de crescimento endotelial

ENA Proteína ativadora de neutrófilos derivada do epitélio

eNOS Óxido nítrico sintase endotelial
FGF Fator de crescimento de fibroblasto
GADPH Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
G-CSF Fator estimulante de colônia de granulócito

GM-CSF Fator estimulante de colônia de granulócito macrófago

GSH Glutationa

GRO Oncogene relacionado ao crescimento

HB-EGF Fator de crescimento ligado a heparina EGF-like

HGF Fator de crescimento de hepatócitos

HIF-1 Fator induzível por hipóxia - 1

HO-1 Heme oxigenase-1

HPLC Cromatografia líquida de alta performance HUVEC Célula endotelial de cordão umbilical humano

I-309 Pequena citocina A1 induzível

IFN Interferon gama

IGF-I Fator de crescimento semelhante a insulina

IL Interleucina

I-TAC Quimioatraente α de célula T induzivel por interferon

LA Ácido linoléico

L-NMMA NG-monometil-L-arginina

LNO₂ Nitrolinoleato
LPS Lipopolissacarídeo

MCP-1 Proteina quimiotática de monócito -1

MKP-1 Fosfatase de MAPK-1

MMP Metaloprotease

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

N₂O₃ Trióxido de dinitrogênio

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato

NF-κB Fator nuclear κB NO Óxido nítrico

'NO₂, Dióxido de nitrogênio

 NO_2 , Nitrito

NO₂⁺ Ânion nitrônio

NO₂BF₄ Tetrafluoborato de nitrônio

NO₂-FA Ácido graxo nitrado/Lípide nitrado

NO3-NitratoOAácido oléicoOANO2Nitroleato

ONOO Peroxinitrito

PAF Fator ativador de plaquetas

PD-ECGF Fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas PDGF-BB/R Fator de crescimento derivado de plaquetas/receptor do fator de

crescimento derivado de plaquetas

PECAM-1 Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PHD Prolil-hidroxilase

PI3K Fosfatidilinositol 3 quinase

PIGF Fator de crescimento induzido pela placenta

PKB Proteína quinase B PKC Proteína quinase C

PPAR Receptor do proliferador de peroxissoma

RNS Espécies reativas de nitrogênio

SP-1 esfingosina-1 fosfato

TGF-β Fator de crescimento derivado de tumor

Tie-2 Receptor tirosina quinase específico do endotélio

TIMP Inibidor tissular de Metaloprotease

TNF Fator de necrose tumoral

t/uPA / uPAR Ativador de plasminogênio tipo tissular/uroquinase/ receptor

VCAM-1 Molécula de adesão de célula vascular

VEGF/VEGFR Fator de crescimento endotelial vascular/ receptor do fator de

crescimento endotelial vascular

Sumário

1.0 Introdução	7
1.1 Formação de vasos sanguíneos 1	7
1.2 Células endoteliais 1	8
1.3 O processo de angiogênese: eventos celulares 1	9
1.4 Reguladores do processo angiogênico	22
1.4.1 Modulação da angiogênese por hipóxia2	23
1.4.2 O sistema VEGF/VEGFR	25
1.4.3 Óxido nítrico como modulador da angiogênese	26
1.5 Angiogênese fisiológica versus patológica	28
1.6 A angiogênese é um dos fatores críticos na progressão e desestabilização de	
placas ateroscleróticas	29
1.7 Ácidos graxos nitrados: uma nova classe de mediadores lipídicos	31
1.7.1 Formação 3	31
1.7.2 Detecção <i>in vivo</i>	33
1.7.3 Sinalização celular	34
1.7.3.1 Lípides nitrados como doadores de *NO	34
1.7.3.2 Sinalização celular via reações eletrofílicas	35
1.7.3.3 Lípides nitrados como ligantes de PPAR	37
1.7.3.4 Atividade antiinflamatória dos lípides nitrados	37
2.0 Objetivos	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	10
3.0 Materiais e Métodos	11
3.1 Materiais	11
3.1.1 Reagentes	11
3.1.2 Cultura celular e transfecção4	12
3.1.2.1 Células	12
3.1.2.2 Transfecção lentiviral de células endoteliais4	12
3.1.2.3 Condições de cultura4	13
3.2 Métodos	13
3.2.1 Síntese de LNO ₂	13

3.2.3 Caracterização química do LNO2
3.2.5 Análise de proliferação celular em células endoteliais. 3.2.6 Análise da migração celular. 3.2.7 Análise de angiogênese em modelo ex vivo. 3.2.8 Análise de angiogênese em modelo in vivo. 3.2.9 Extração de RNA Total. 3.2.10 Sintese de cDNA. 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica. 3.2.11.1 Desenho dos primers 3.2.11.2 Reação de real time PCR. 3.2.12.1 Detecção da expressão de proteínas. 3.2.12.1 Western Blot. 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA. 3.2.12.3 Protein array. 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO ₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ coorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo. 4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
3.2.6 Análise da migração celular 3.2.7 Análise de angiogênese em modelo ex vivo 3.2.8 Análise de angiogênese em modelo in vivo 3.2.9 Extração de RNA Total 3.2.10 Síntese de cDNA 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica 3.2.1.1 Desenho dos primers 3.2.1.1.2 Reação de real time PCR 3.2.1.2 Detecção da expressão de proteínas 3.2.1.2.1 Western Blot 3.2.1.2.1 Western Blot 3.2.1.2.3 Protein array 3.2.1.3 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.1.4 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
3.2.7 Análise de angiogênese em modelo ex vivo. 3.2.8 Análise de angiogênese em modelo in vivo. 3.2.9 Extração de RNA Total. 3.2.10 Síntese de cDNA. 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica. 3.2.1.1 Desenho dos primers. 3.2.1.1.2 Reação de real time PCR. 3.2.1.2 Detecção da expressão de proteínas. 3.2.1.1 Western Blot. 3.2.1.2.1 Western Blot. 3.2.1.2.3 Protein array. 3.2.1.3 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.1.4 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Sintese e caracterização de LNO ₂ . 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo. 4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
3.2.8 Análise de angiogênese em modelo <i>in vivo</i> 3.2.9 Extração de RNA Total 3.2.10 Síntese de cDNA 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica 3.2.11.1 Desenho dos primers 3.2.11.2 Reação de real time PCR 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas 3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
3.2.9 Extração de RNA Total. 3.2.10 Síntese de cDNA 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica 3.2.11.1 Desenho dos primers 3.2.11.2 Reação de real time PCR 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas 3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
3.2.10 Síntese de cDNA 3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica 3.2.11.1 Desenho dos primers 3.2.11.2 Reação de real time PCR 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas 3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4 LNO ₃ e OANO ₄ induzem a migração de células endoteliais 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica. 3.2.11.1 Desenho dos primers. 3.2.11.2 Reação de real time PCR. 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas. 3.2.12.1 Western Blot. 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA. 3.2.12.3 Protein array. 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Sintese e caracterização de LNO ₂ . 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO ₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
3.2.11.1 Desenho dos primers 3.2.11.2 Reação de real time PCR 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas 3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.3 LNO ₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
3.2.11.2 Reação de real time PCR 3.2.12 Detecção da expressão de proteínas 3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.3 LNO ₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
3.2.12 Detecção da expressão de proteínas. 3.2.12.1 Western Blot. 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA. 3.2.12.3 Protein array. 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO ₂ . 4.2 LNO ₂ e OANO ₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO ₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO ₂ e OANO ₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO ₂ e OANO ₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO ₂ -FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
3.2.12.1 Western Blot 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA 3.2.12.3 Protein array 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases 3.2.14 Análise estatística 4.0 Resultados 4.1 Síntese e caracterização de LNO2 4.2 LNO2 e OANO2 não alteram a viabilidade celular de células endoteliais 4.3 LNO2 não altera a proliferação celular de células endoteliais 4.4 LNO2 e OANO2 induzem a migração de células endoteliais 4.4.1 A migração celular induzida por LNO2 e OANO2 ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO2-FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
 3.2.12.2 Determinação de proteína por ELISA. 3.2.12.3 Protein array. 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 3.2.12.3 Protein array. 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases. 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 3.2.14 Análise estatística. 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.0 Resultados. 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.1 Síntese e caracterização de LNO₂. 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais. 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.3 LNO₂ não altera a proliferação celular de células endoteliais. 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais. 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO. 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i>. 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal. 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados.
 4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO 4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo <i>ex vivo</i> 4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal 4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
dependente de *NO
4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal
4.6 Lípides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal
4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados
4.7.1 Lípides nitrados estimulam a expressão de genes pró-angiogênicos
4.7.2 LNO ₂ estimula a secreção de proteínas pró-angiogênicas em cultura de células
endoteliais
4.7.3 LNO ₂ aumenta a atividade de MMP-9
4.7.4 Lípides nitrados induzem o acúmulo da proteína HIF-1α
4.7.5 Os efeitos pró-angiogênicos dos NO ₂ -FA são mediados por HIF-1α

5.0 Discussão	97
6.0 Conclusões	106
7.0 Referências Bibliográficas	108
Anexo A: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de	
Mestrado/Doutorado	127
Anexo B: Parecer do Comitê de Ética referente ao Projeto	128
Anexo C: Ficha do aluno	129
Anexo D: Currículo Lattes	131

1.0 Introdução

1.1 Formação de vasos sanguíneos

O sistema vascular é constituído por uma rede de diversos vasos sanguíneos (artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares) que diferem em sua estrutura e calibre. Sua função não está limitada apenas ao transporte e troca de fluidos, gases, e macromoléculas entre células, tecidos e órgãos, mas também compreende a manutenção da homeostase total do organismo por estabilizar pH e temperatura corporal (Fraisl *et al.*, 2009).

O desenvolvimento dos vasos sanguíneos e do sistema vascular é um dos eventos iniciais da organogênese originado inicialmente pela vasculogênese, um processo pelo qual células endoteliais precursoras, denominadas angioblastos dão origem a vasos sanguíneos em locais onde não há vasos (Risau, 1997). Uma vez o plexo capilar primário formado, o mesmo é posteriormente remodelado para um sistema vascular maduro com vasos de diferentes tamanhos (Adams e Alitalo, 2007). Este remodelamento ocorre através do brotamento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, processo denominado angiogênese (Folkman, 1984).

A angiogênese é um processo de remodelamento complexo, no qual diversos eventos altamente coordenados, tais como migração, proliferação, brotamento de células endoteliais e perivasculares levam ao desenvolvimento da maioria dos vasos sanguíneos em uma rede vascular funcional (Coultas *et al.*, 2005). Por fim, um terceiro processo, denominado arteriogênese, no qual ocorre o crescimento de artérias colaterais a partir de anastomoses arterio-arteriolares pré-existentes também contribui para o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Heil *et al.*, 2006).

1.2 Células endoteliais

Em nível celular, o processo de angiogênese envolve ao menos dois tipos celulares distintos, as células endoteliais e as células denominadas "murais" também conhecidas como perivasculares (pericitos e células vasculares de músculo liso) (Gaengel et al., 2009). Além disso, o processo de angiogênese requer uma variedade de eventos celulares, tais como migração, proliferação, sobrevivência celular bem como diferenciação e especialização celular (Tomanek e Schatteman, 2000) que serão apresentadas detalhadamente na próxima seção.

Recentemente tem sido proposto que diversos tipos de células endoteliais especializadas - cada qual com especificações distintas de destino celular - são fundamentais no processo de angiogênese (Horowitz e Simons, 2008).

O primeiro tipo celular reconhecido é denominado de *tip cell*, ou célula líder. De acordo com Gerhardt e colaboradores (2003), as células líderes são responsáveis pela condução do brotamento de um novo vaso sanguíneo. Estas células são altamente polarizadas e reagem a gradientes do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) migrando em direção ao estímulo por meio da formação de filopodias. Além disso, esse tipo celular apresenta algumas características peculiares destacando-se: (1) incapacidade de formar um lúmen, (2) baixa taxa de proliferação e (3) competência em ativação de proteases que degradam momentaneamente a membrana basal adjacente (Phng e Gerhardt, 2009).

Por sua vez, as células endoteliais que seguem as *tip cells*, são denominadas como *stalk cells* ou células seguidoras. Estas, quando estimuladas com VEGF proliferam e produzem pouca filopodia (Gerhardt *et al.*, 2003). Esse tipo celular também forma o lúmen vascular e junções celulares que mantém a integridade dos novos brotamentos bem como estabelece a matriz extracelular e o recrutamento/aderência das células murais.

Mais recentemente foram descritas também as células denominadas *phalanx cells*, as quais são apontadas como as células endoteliais mais quiescentes do processo de angiogênese (Mazzone *et al.*, 2009). Ao contrário das células líderes e similarmente às células seguidoras, estas células formam pouca filopodia, raramente migram em reposta ao VEGF, formam um lúmen vascular, bem como, estabelecem junções celulares.

Os fenótipos de célula líder e de célula seguidora não são fenótipos estáveis das células endoteliais (Hellstrom *et al.*, 2007; Siekmann e Lawson, 2007), mas seriam resultantes de um processo competitivo altamente dinâmico. Durante esse processo, as células endoteliais, após sofrerem estímulos de VEGF, competiriam pelo fenótipo de célula líder via ativação de cascatas de sinalização do ligante delta-like 4 (Dll4) e seu receptor, Notch. Baseado nessa lógica, a célula capaz de produzir maior concentração de Dll4 se sobressairia como célula líder do processo de angiogênese por reprimir efetivamente as células vizinhas via a cascata de sinalização de Notch (Siekmann e Lawson, 2007; Suchting *et al.*, 2007; Hellstrom *et al.*, 2007).

É importante salientar, no entanto, que o mecanismo de supressão da formação de células líderes pela via de sinalização desencadeada por Notch ainda não foi completamente elucidado, embora estudos recentes indiquem que esse processo poderia ser mediado por VEGF e seus receptores endoteliais.

1.3 O processo de angiogênese: eventos celulares

A angiogênese é rapidamente iniciada através da liberação de citocinas em resposta a condições de hipóxia, isquemia ou processos que afetam a homeostasia vascular (Griffioen e Molema, 2000). Durante a iniciação da angiogênese diversas cascatas de sinalização são ativadas, levando conseqüentemente ao aumento de mediadores pró-

angiogênicos, tais como, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o VEGF, a angiopoietina-2 e/ou diversas proteases (Pugh e Ratcliffe, 2003).

O VEGF é apontado como o principal fator do processo de angiogênese, particularmente em sua fase inicial, por meio da indução da produção e liberação de óxido nítrico ('NO), uma molécula cuja formação é catalisada pela eNOS que promove a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (Ku *et al.*, 1993; Ziche *et al.*, 1997). Concomitante à vasodilatação, o desprendimento de pericitos da parede dos vasos também é observado (Senger *et al.*, 1983).

Posteriormente, a lâmina basal e a matriz extracelular são degradadas, liberando fatores de crescimento ligados à matriz extracelular, tais como VEGF e o fator de crescimento de fibroblasto, FGF (Lee *et al.*, 2005). Evidências demonstram que as proteases do ativador de plasminogênio e as metaloproteases de matriz (MMPs), MMP2, MMP3 e MMP9, bem como seus inibidores correspondentes, PAI1 ou TIMP estão envolvidos neste processo (Kalluri, 2003).

A degradação da membrana basal e a matriz extracelular local favorecem a migração de células lideres para o espaço perivascular em direção aos quimioatraentes e mitógenos pró-angiogênicos através da formação de numerosas filopodias (Gerhardt *et al.*, 2003; Ruhrberg, 2003). As células líderes são então seguidas por células seguidoras, as quais proliferam formando um novo brotamento. Níveis de expressão aumentada do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDFG) nas células líderes promovem o recrutamento de células perivasculares, as quais expressam o receptor β de PDGF (PDFGRβ) (Hellstrom *et al.*, 2001) e fornecem estabilidade para o vaso recém formado, contribuindo para sua maturação.

Além da sinalização de PDGF/ PDFGRβ, as cascatas de sinalização de esfingosina-1-fosfato e seu receptor, das angiopoietinas 1 e 2 e seus receptores Tie1 e Tie2 (livanainen et al., 2003) e do fator de crescimento β derivado de tumor (TGFβ) (Sato e Rifkin, 1989) são ativadas durante a maturação de novos vasos sanguíneos. A ativação dessas cascatas de sinalização controla a quiescência vascular, o recrutamento e a diferenciação das células perivasculares bem como a produção de componentes da matriz extracelular (Dickson et al., 1995; Hirschi et al., 1998; Oh et al., 2000).

O estabelecimento do fluxo sanguíneo no vaso recém-formado requer a formação de um novo lúmen, processo que ocorre concomitantemente à migração e proliferação das células endoteliais. Embora o conhecimento sobre a lumenização de vasos sanguíneos seja escasso, fortes evidências apontam para o envolvimento dos processos de pinocitose e de formação de vacúolos (Iruela-Arispe e Davis, 2009). Dados provenientes de estudos em modelo de *zebrafish* suportam a hipótese de que novos lúmens vasculares são formados a partir da formação intracelular de vacúolos e subseqüente fusão intercelular dos vacúolos maiores (Kamei *et al.*, 2006). A Figura 1 apresenta as etapas do processo de angiogênese bem como ilustra os diferentes fenótipos de células endoteliais que participam do processo.

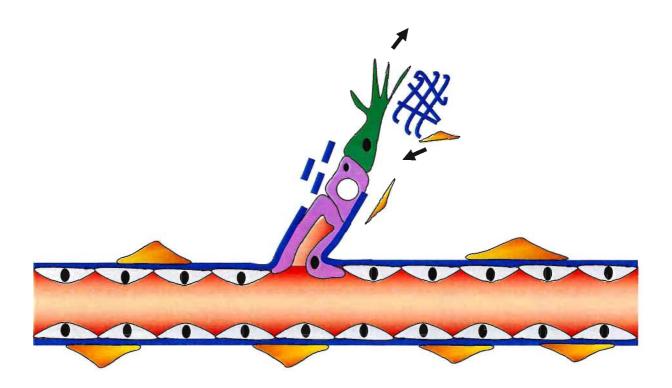


Figura 1.0 processo de angiogênese. Durante a formação de um novo vaso sanguíneo a partir de um vaso pré-existente a lâmina basal (em azul) é degradada, as células perivasculares (em amarelo) se desprendem. A célula líder (em verde) migra em direção ao estimulo pró-angiogênico invadindo o espaço perivascular seguida pelas células seguidoras (em roxo) as quais proliferam. Concomitantemente, a matriz extracelular (também em azul) é degradada e fatores de crescimento são liberados, um novo lúmen é formado e células perivasculares são recrutadas e aderem ao brotamento conferindo maturação e estabilidade ao vaso recém formado. Em cinza o fenótipo de células endoteliais denominado *phalanx cells* também é representado.

1.4. Reguladores do processo angiogênico

O processo de angiogênese é regulado pelo equilíbrio entre diversos mediadores pro- e anti-angiogênicos, tais como fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão. Nessa seção as influências do fator de transcrição HIF-1, do sistema VEGF e seus receptores e do óxido nítrico sobre o processo angiogênico serão apresentadas em detalhe.

1.4.1 Modulação da angiogênese por hipóxia

A hipóxia é uma das principais causas fisiopatológicas moduladoras da angiogênese (Semenza, 2003). A resposta transcricional de células de mamíferos à hipóxia é amplamente mediada pelo fator de transcrição induzível por hipóxia-1 (HIF-1). HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico composto de uma subunidade β (conhecida também como translocador nuclear do receptor de aril de hidrocarbono, ARNT), que é constitutivamente expressa (Wang *et al.*, 1995) e uma subunidade α, a qual é oxigêniosensível. Três isoformas da subunidade HIFα já foram descritas (Schofield e Ratcliffe, 2004). Estas podem se dimerizar com a subunidade HIFβ e formar um complexo transcricional ativo e induzir mais de 60 genes envolvidos na sobrevivência celular, metabolismo e angiogênese bem como na vasodilatação, eritropoiese e autofagia (Semenza, 2003).

A atividade transcricional da subunidade HIFα é regulada por várias modificações pós-traducionais tais como, hidroxilação (Bruick e McKnight, 2001), nitrosilação (Yasinska e Sumbayev, 2003), fosforilação (Richard *et al.*, 1999) e acetilação (Jeong *et al.*, 2002).

Em condições normais de tensão de oxigênio (normóxia), oxigenases dependentes de 2-oxoglutarato, denominadas prolil-4-hidroxilases (PHDs) utilizam O_2 para hidroxilar resíduos de prolina de HIF α (Kaelin, Jr. e Ratcliffe, 2008). De acordo com Semenza (2003), esse processo possibilita o reconhecimento de HIF α por um complexo ubiquitina-ligase contendo o fator von Hippel-Lindau, uma proteína supressora de tumor, o que promove sua poli-ubiquitinação, seguida de degradação proteossômica. Um resíduo de asparagina de HIF α pode ainda ser hidroxilado pelo fator inibitório de HIF (FIH) (Peet e Linke, 2006), impedindo a interação de HIF α com seu co-ativador transcricional p300, abolindo conseqüentemente, a indução de genes alvo (Kaelin, Jr. e Ratcliffe, 2008).

Sob condições de hipóxia, as enzimas catalisadoras da hidroxilação de HIFα se tornam inativas e a proteína HIFα é, desse modo, estabilizada e se transloca para o núcleo (Kallio *et al.*, 1998). Uma vez no núcleo, HIFα interage com a subunidade HIFβ formando um complexo ativo que se liga a seqüências especificas de DNA, denominadas como elemento responsivo à hipóxia (HRE) nos promotores e *enhancers* dos genes alvo (Brahimi-Horn e Pouyssegur, 2009). Para a ativação dos genes alvo vários co-ativadores são recrutados se ligando ao complexo de HIF-1, tais como o complexo CBP (*CREB binding protein*)/p300, o co-ativador SRC-1 (co-ativador 1 do receptor de esteróide) e o Tie-2 (fator intermediário 2 da transcrição) (Giaccia *et al.*, 2003; Carrero *et al.*, 2000). Essa interação aumenta o poder transcricional de HIF-1 de uma maneira dependente de oxigênio e produz um efeito sinérgico com CBP.

Segundo Acker e Plate (2002), não somente tensões de oxigênio influenciam a atividade de HIF-1, mas também mecanismos adicionais são reconhecidos atualmente, tais como oncogenes e genes supressores de tumor, doadores de óxido nítrico e cascatas de sinalização de fatores de crescimento.

Diversos estudos sugerem que HIF-1 pode atuar como um regulador intrínseco do funcionamento e crescimento de células endoteliais por estimular a expressão de ligantes e receptores. Por exemplo, a subunidade HIFα tem sido associada com a modulação da expressão de VEGF e seus receptores 1 e 2 e Tie-2 (Gerber *et al.*, 1997; Elvert *et al.*, 2003; Kappel *et al.*, 1999; Favier *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 1997). Por sua vez, há evidências para um papel de HIFβ nas etapas iniciais do desenvolvimento de vasos sanguíneos durante a embriogênese por meio da liberação parácrina de citocinas angiogênicas, tais como VEGF e angiopoeitina-1, pelas células hematopoiéticas. Interessantemente, a estabilização de HIFα por um peptídeo denominado peptídeo regulador 39 em diferentes linhagens de células endoteliais resultou em expressão aumentada de VEGF e formação acelerada de estruturas vasculares (Li *et al.*, 2000).

Ademais, a inibição transgênica específica de HIF em células endoteliais com um mutante negativo dominante de HIF resultou na letalidade do embrião devido à insuficiência cardíaca e falhas no remodelamento vascular (Licht *et al.*, 2006). Em conjunto, essas evidências corroboram com a visão de que o fator de transcrição HIF é um dos mediadores mais importantes no processo de angiogênese.

1.4.2 O sistema VEGF/VEGFR

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) pertence a uma família de sete fatores de crescimento (VEGF-A a F e PIGF, fator de crescimento placentário), que se ligam diferencialmente a três receptores tirosina quinase (VEGFR1-3) (Ferrara *et al.*, 2003). Enquanto a expressão de VEGFR1 e VEGFR2 é predominante em células endoteliais de vasos sanguíneos, VEGFR3 é primariamente expresso em células endoteliais do sistema linfático (Kaipainen *et al.*, 1995).

A importância do sistema de VEGF e seus receptores (VEGFR) como regulador crítico da formação e desenvolvimento de vasos sanguíneos foi demonstrada em camundongos *knockout*. Por exemplo, uma série de estudos demonstrou que a perda de um dos alelos de VEGF é embrionicamente letal devido à deficiência dos processos de vasculogênese e angiogênese (Fong *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996; Shalaby *et al.*, 1995). Ademais, o sistema VEGF/VEGFR estimula o crescimento de células endoteliais, regula o tônus vascular, a produção de proteases, a migração, proliferação e sobrevivência celular (Ferrara *et al.*, 2003) bem como aumenta a permeabilidade celular (Senger *et al.*, 1983).

Diversas evidências indicam que o VEGFR2 não somente modula as funções de células endoteliais durante o processo de angiogênese, mas também estimula a interação

com moléculas de adesão tais como a VE-caderina (Carmeliet e Collen, 1999; Grazia *et al.*, 2003) ou as integrinas ανβ3 e ανβ5 (Friedlander *et al.*, 1995; Soldi *et al.*, 1999). Além disso, VEGF induz um aumento na permeabilidade vascular, que pode ser inibida por angiopoiteina-1 (Gamble *et al.*, 2000; Thurston *et al.*, 2000).

A hipóxia é apontada como o principal fator regulatório da expressão de VEGF no processo de angiogênese através da sinalização do fator de transcrição HIF-1 (Ferrara *et al.*, 2003). Além de HIF, diversos sítios de ligação de fatores de transcrição, tais como AP-1, Sp1, NFkB e CREB foram identificados na região promotora de VEGF (Shima *et al.*, 1996; Damert *et al.*, 1997) sugerindo o envolvimento de outros fatores de transcrição na expressão aumentada de VEGF.

1.4.3 Óxido nítrico como modulador da angiogênese

O óxido nítrico ('NO) é um radical livre produzido endogenamente e reconhecido como um mediador bioativo. A produção endógena de 'NO ocorre especialmente através de reações catalisadas pela família das isoformas da óxido nítrico sintase, as quais catalisam a oxidação de L-arginina em L-citrulina na presença de oxigênio e NADPH (Bruckdorfer, 2005).

Estudos prévios indicam que o 'NO pode atuar como um importante modulador do processo angiogênico, estimulando ou inibindo a neovascularização (Ziche e Morbidelli, 2000). Essa dicotomia pode ser explicada pelo fato da ativação/inibição de diferentes rotas de sinalização celular serem dependentes de diferentes tempos de exposição e concentrações de 'NO (Isenberg *et al.*, 2005). Enquanto baixas concentrações de doadores de 'NO têm demonstrado respostas pró-angiogênicas, altas concentrações demonstram efeitos inibitórios (Urbich *et al.*, 2002).

De acordo com investigações recentes, os efeitos anti-angiogênicos mediados por altas concentrações de 'NO podem ser resultantes da ativação de MKP-1 e da indução da fosforilação de grupamentos de serina da proteína p53, levando, em última análise, à morte celular (Urbich *et al.* 2002). Altas concentrações de 'NO podem ainda inibir a fosforilação da proteína quinase C (PKC), de ERK e de JUN, e a atividade ligante de AP-1 (Jones *et al.*, 2004; Ridnour *et al.*, 2005).

Em contrapartida, baixas concentrações de 'NO podem estimular a angiogênese por mecanismos diretos e indiretos. Por exemplo, a exposição a 'NO aumenta a síntese de DNA, a proliferação celular e a migração de células endoteliais por rotas dependentes de GMPc, bem como por meio de S-nitrosilação (Oliveira et al., 2003; Kawasaki et al., 2003).

De acordo com Fukumura e colaboradores (2006), o 'NO pode mediar a função de diversos fatores angiogênicos, incluindo VEGF, angiopoietina-2 e estrógeno (Xu *et al.*, 2002), PDGF (Kourembanas *et al.*, 1993), PD-ECGF (Ignatescu *et al.*, 1999), uPA, FGF (Ziche *et al.*, 1997) e TGFβ. Interessantemente, a modulação da atividade de MMPs e de inibidores endógenos de MMPs em células musculares lisas também tem sido associada ao efeito de baixas concentrações de 'NO (Tronc *et al.*, 2000).

Finalmente, o 'NO é um importante modulador da expressão de fatores angiogênicos, sendo a expressão de VEGF o principal foco de estudo (Chin *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 1999; Shizukuda *et al.*, 1999; Dulak *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2000; Sandau *et al.*, 2001; Jozkowicz *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2002). A estabilização de HIF-1α, sua ligação ao DNA e a sua transativação, levando à expressão aumentada de seus genes alvo, em especial de VEGF, tem sido observada com diversos doadores de 'NO em condições normais de oxigênio (Brune e Zhou, 2007). Segundo Metzen e colaboradores (2003), o 'NO bloqueia a atividade das enzimas que catalisam a hidroxilação de HIF-1α, por meio de interação direta. Além disso, o 'NO pode

regular a estabilidade de HIF-1 α por S-nitrosilação (Sumbayev *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007) bem como ativar a transcrição/tradução de HIF-1 α (Kasuno *et al.*, 2004). De fato, a ativação induzida por 'NO no promotor de VEGF sob normóxia indicou que os elementos responsivos ao 'NO são o sítio de ligação de HIF-1 α e uma seqüência adjacente localizada na seqüência do elemento responsivo à hipóxia (Kimura *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001).

1.5 Angiogênese fisiológica versus patológica

Como citado em seções prévias, o desenvolvimento dos vasos sanguíneos ocorre predominantemente pelo processo de angiogênese. Esse processo é essencial para o crescimento e o desenvolvimento embrionário onde a vasculatura primária bem como a vasculatura adequada para o crescimento e desenvolvimento dos órgãos são estabelecidas (Folkman, 1995).

A vasculatura de indivíduos adultos é, todavia, quiescente, onde apenas 0,01% de todas as células endoteliais apresentam-se em estado proliferativo (Hobson e Denekamp, 1984). No entanto, embora o processo angiogênico seja relativamente raro em indivíduos adultos, o mesmo constitui o principal mecanismo de vascularização durante uma variedade de processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento placentário, formação do corpo lúteo, cicatrização e maturação ocular (Folkman, 1995). Isso se torna possível devido ao fato das células endoteliais, apesar de quiescentes, manterem a capacidade de rápida divisão em resposta a estímulos fisiológicos, podendo resultar na ativação do processo de angiogênese. Desse modo, temos a indução da angiogênese fisiológica.

O desequilíbrio entre os mediadores pró- e anti-angiogênicos propicia, por sua vez, a inibicão do processo de angiogênese bem como um crescimento exacerbado de novos

vasos o que é denominado como angiogênese patológica (Hanahan e Folkman, 1996). Desse modo, a angiogênese é positivamente associada à patogênese de mais de 70 condições clínicas incluindo câncer, obesidade, cegueira, doença cardíaca isquêmica, doenças infecciosas, imunes e principalmente inflamatórias (Carmeliet, 2005). Além disso, durante a angiogênese fisiológica, os vasos sangüíneos recém formados se tornam rapidamente estáveis e as células endoteliais quiescentes. Porém, em condições patológicas os vasos sangüíneos novos se encontram sob constante remodelamento resultando em um sistema vascular anormal.

1.6 A angiogênese é um dos fatores críticos na progressão e desestabilização de placas ateroscleróticas

A angiogênese tem sido apontada como um fator crítico para a progressão e desestabilização das placas ateroscleróticas. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado um número aumentado de microvasos na camada íntima das artérias durante o processo de aterosclerose (Barger et al., 1984; Kumamoto et al., 1995; Williams et al., 1988; Zamir e Silver, 1985). No entanto, segundo Langheinrich e colaboradores (2007), a função exata do processo de angiogênese na aterosclerose não está completamente definida. Em lesões iniciais, a angiogênese poderia contribuir com o desenvolvimento da lesão através do suprimento de oxigênio e nutrientes para a placa aterosclerótica, bem como pela condução de células inflamatórias (Langheinrich et al., 2007). Os experimentos de Moulton e colaboradores (1999, 2003), por exemplo, indicam que o tratamento prolongado com inibidores da angiogênese reduz a neovascularização, assim como o crescimento da placa aterosclerótica em camundongos deficientes de apolipoproteína E. Juntos esses achados indicam que a neovascularização pode promover o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Moulton et al., 2003; Moulton et al., 1999).

A neovascularização também é uma característica notável no estágio avançado da aterosclerose, especialmente sua associação com a inflamação crônica e a desestabilização da placa aterosclerótica (Zamir e Silver, 1985). Kumamoto e colaboradores (1995) observaram uma correlação positiva entre o número de novos vasos e a severidade das placas ateroscleróticas em humanos. Além disso, Langheinrich e colaboradores (2006), demonstraram que, em lesões avançadas de camundongos duplo *knockouts* para o gene da apolipoproteína E e para o gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade, o volume da lesão aterosclerótica está fortemente associado à neovascularização.

De acordo com Virmani e colaboradores (2005), a neovascularização pode favorecer, de modo direto, a ruptura da placa aterosclerótica, uma vez que os microvasos são fontes potenciais de hemorragia dentro da lesão. Desde que os capilares na placa são mecanicamente frágeis e mais propensos ao sangramento ao serem expostos às forças hemodinâmicas, a hemorragia dentro da placa pode iniciar, secundariamente, outras respostas inflamatórias e bioquímicas levando, por conseguinte, à ruptura da placa e à trombose arterial (Virmani et al., 2005). De fato, Kolodgie e colaboradores (2003), demonstraram que a hemorragia intraplaca está positivamente associada ao aumento no tamanho do núcleo necrótico e na instabilidade das lesões de placas coronarianas.

Estudos prévios (Galis *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1993) apontam, ainda, que a neovascularização pode propiciar a ruptura de lesões ateroscleróticas de modo indireto, através da ativação de proteases e células inflamatórias. Galis e colaboradores (1994), por exemplo, fortificam essa hipótese, demonstrando a presença das MMP-2 e MMP-9 em regiões vulneráveis da placa aterosclerótica, as quais degradam colágeno e matriz fibrosa, estimulando o remodelamento tecidual e alterando a estabilidade da placa.

Ademais, diversos estudos (Antonov et al., 2004; Barrett e Benditt, 1988; Bobik et al., 1999; Ignatescu et al., 1999; Lappalainen et al., 2004; Lupia et al., 2003; Lupu et al., 1995; Ma et al., 2002; Nakata et al., 1996) têm relatado a expressão de mais de 10 fatores

pró-angiogênicos em lesões ateroscleróticas humanas, os quais são secretados por macrófagos e células de músculo liso vasculares.

Embora a presença desses diversos fatores pró-angiogênicos esteja bem descrita em lesões ateroscleróticas, VEGF é o fator pró-angiogênico melhor caracterizado (Celletti *et al.*, 2001). Segundo Couffinhal e colaboradores (1997), apesar da expressão pós-natal de VEGF ser uma característica de vasos sangüíneos normais, a expressão deste fator pró-angiogênico encontra-se aumentada em lesões ateroscleróticas.

1.7 Ácidos graxos nitrados: uma nova classe de mediadores lipídicos

1.7.1 Formação

Durante os processos inflamatórios, tais como aterosclerose, um aumento nos níveis de 'NO é observado (Donnini e Ziche, 2002). Além disso, a ativação de células inflamatórias induz a geração de uma variedade de espécies reativas de oxigênio, incluindo o radical superóxido, favorecendo a formação de várias espécies reativas de nitrogênio (RNS), tais como 'NO₂, ONOO', N₂O₃, NO₂, NO₃.

Segundo Eiserich e colaboradores (1998), as RNS podem interagir tanto *in vitro* como *in vivo* com lípides insaturados ocasionando a inibição ou iniciação da lipoperoxidação, ou ainda, a nitração de ácidos graxos insaturados. Como resultado da nitração desses ácidos graxos, derivados oxidados nitrados são formados, podendo alterar a biodisponibilidade de 'NO.

De fato, a reação de 'NO₂ com ácidos graxos insaturados da fosfatilcolina foi o primeiro evento de nitração lipídica investigado (Finlayson-Pitts *et al.*, 1987). Posteriormente, a nitração do ácido oléico foi reportada (Kobayashi, 1983). Dados indicam que a formação da espécie reativa 'NO₂ é o fator limitante da nitração dos ácidos graxos poliinsaturados (Eiserich *et al.*, 1998). Esse radical pode ser gerado via reações mediadas por peroxinitrito (ONOO⁻), reações de protonação de nitrito (NO₂⁻), reações aeróbicas de 'NO, reações de adição iônica de NO₂⁺, bem como reações de oxidação de NO₂⁻ a 'NO₂ mediadas por peroxidases, microperoxidases e metais de transição (Baker *et al.*, 2009).

Dois mecanismos de nitração de ácidos graxos insaturados foram identificados até o momento: a reação de adição e a reação de abstração de hidrogênio mediado por 'NO₂. O equilíbrio competitivo entre essas duas reações é dependente da concentração de 'NO₂. Em concentrações relativamente altas de 'NO₂ as reações de adição geram nitro e dinitro-alcenos, ao passo que, em concentrações baixas de 'NO₂ (na faixa de ppm) as reações de abstração de hidrogênio são favorecidas, resultando na formação de hidroperóxidos alílicos, nitrohidroperoxidos alilicos e ésteres nitrados (Gallon e Pryor, 1993; Gallon e Pryor, 1994; Pryor e Lightsey, 1981; Finlayson-Pitts *et al.*, 1987).

De acordo com Freeman e colaboradores (2008), a grande abundância e disponibilidade de ligações duplas presentes nas estruturas dos ácidos oléico e linoléico os torna os principais ácidos graxos poliinsaturados alvos do processo de nitração. Realmente, a nitração *in vitro* dos ácidos oléico e linoléico foi descrita (O'Donnell *et al.* 1999), bem como a síntese de nitroaraquidonato (AANO₂), o produto da nitração do ácido araquidônico (Trostchansky *et al.* 2007), entre outros.

A Figura 2 ilustra as estruturas químicas dos principais produtos de nitração dos ácidos graxos poliinsaturados descritos até o presente momento.

Figura 2. Estruturas químicas de NO₂-FAs. Estruturas químicas dos isômeros de LNO₂ (Lima *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2004), OANO₂ (Baker et al., 2005) e AANO₂ (Trostchansky *et al.* 2007) descritos até o momento.

1.7.2 Detecção in vivo

Balazy e colaboradores (2001) foram os primeiros que detectaram lípides nitrados (NO₂-FA) em tecido de mamífero com a caracterização do ácido nitro-hidroxi-eicosatrienóico [AA(OH) NO₂] em extratos hidrolisados de tecido cardíaco bovino (Balazy *et al.*, 2001).

Posteriormente, a presença do acido nitrolinoléico (10- e 12-nitro-9,12-acido octadecadienoico, LNO₂) e nitro-oléico (9- e 10-nitro-9-ácido cis-octadecenóico, OANO₂), produtos da nitração dos ácidos linoléico e oléico, respectivamente foram detectadas no plasma (Lima et al., 2002; Lima et al., 2003; Baker et al., 2004), eritrócitos (Baker et al., 2004), urina (Baker et al., 2005) e lipoproteínas de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos (Lima et al., 2002). Interessantemente, Lima e colaboradores (2002) demonstraram que pacientes hiperlipidêmicos possuem níveis elevados de LNO₂ quando comparados a indivíduos normolipêmicos. Ademais, a identificação de colesteril nitrolinoleato, o éster derivado da nitração de colesteril linoleato, foi relatada em plasma e lipoproteínas de indivíduos normolipidêmicos (Lima et al., 2003).

Em adição, Baker e colaboradores (2004) sugerem que os NO₂-FA constituiriam a maior fração bioativa de óxidos de nitrogênio nos vasos sangüíneos (com uma concentração total aproximada de 500 nM). No entanto, estudos recentes apontam que a concentração total estimada de NO₂-FA estaria subestimada (Baker *et al.*, 2009). Por exemplo, um estudo demonstra que após o processo de isquemia-reperfusão a concentração somente de LNO₂ é de aproximadamente 800 nM (Nadtochiy *et al.*, 2009). Além disso, macrófagos ativados por citocinas ou LPS também apresentam nitração aumentada de lípides sugerindo que diferentes processos podem contribuir para a nitração de lípides (Ferreira *et al.*, 2009).

Desse modo, é possível sugerir que a concentração total de NO₂-FA deva ser maior do que a descrita até o momento, bem como sua diversidade, considerando-se a grande variedade de lípides presentes nos tecidos.

1.7.3 Sinalização celular

1.7.3.1 Lípides nitrados como doadores de 'NO

Observações recentes sugerem que os NO₂-FA podem atuar como reservatórios endógenos de 'NO, bem como mediadores pluripotentes de sinalização, agindo via rotas dependentes ou independentes de receptores (Coles *et al* 2002a; Coles *et al* 2002b; Baker *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2005; Schopfer *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2006; Villacorta *et al.*, 2007; Faine *et al.*, 2009). A liberação de 'NO das moléculas de NO₂-FA tem sido proposta por ocorrer de maneira espontânea, sugerindo que os mesmos poderiam atuar como seqüestradores e subseqüentes doadores de 'NO (Lim *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2005; Schopfer *et al.*, 2005a).

De fato, o vasorelaxamento induzido por LNO₂ também foi anterioremente demonstrado (Lim *et al.*, 2002). Segundo Lima e colaboradores (2005) o vasorelaxamento induzido por LNO₂ é dependente da concentração de LNO₂ e da liberação de 'NO. Além disso, o vasorelaxamento também foi demonstrado em anéis aórticos de rato tratados com ácido araquidônico nitrado (Trostchansky *et al.*, 2007).

No entanto, quando particionados em micelas não iônicas ou lipossomas de fosfatidilcolina de colesterol, os NO₂-FA são estabilizados hidrofobicamente. Isto sugere que a esterificação dos ácidos graxos nitrados a lípides complexos de lipoproteínas e membranas basais lhes conferiria uma estabilidade sendo necessária a presença de esterases ou fosfolipases tipo A2 para sua ativação e liberação de 'NO (Schopfer *et al.* 2005b).

Um mecanismo alternativo indicado para a liberação de 'NO dos lípides nitrados em ambientes aquosos, aponta que os NO₂-FA podem ainda liberar o 'NO de sua estrutura através da reação de Nef. De acordo com Schopfer e colaboradores (2005b), a liberação do grupamento 'NO não ocorre de modo direto, além de ser dependente do pH do meio, o que facilitaria a formação do ânion nitronato (R₂-C⁽⁻⁾-NO₂) proveniente da reação entre o ácido graxo nitrado e seus derivados nitrohidroxi vicinais. Seguido de reações de protonação e desprotonação, o intermediário nitroso pode liberar seu grupo 'NO a partir de reações com agentes redutores como ascorbato.

1.7.3.2 Sinalização celular via reações eletrofílicas

A natureza eletrofílica dos NO₂-FA possui um papel fundamental em suas reações, induzindo, por exemplo, reações de adição de Michael com baixas concentrações do ânion

hidróxido presentes em soluções aquosas (Baker *et al.*, 2005). Desse modo, diversos estudos propõem que parte das ações de sinalização dos NO₂-FA seja mediada por nitroalquilação, ou seja, pela formação de adutos covalentes com sítios nucleofílicos de proteínas (Alexander *et al.*, 2006; Batthyany *et al.*, 2006).

Segundo Batthyany e colaboradores (2006), os nitrolípides podem reagir de modo reversível com o ânion tiolato de GSH, bem como com seus grupamentos Cys via adição de Michael, formando o aduto covalente (GS-LNO₂). Realmente, a identificação de adutos covalentes de GSH com LNO₂ e OANO₂ foi descrita em hemácias de pacientes saudáveis. Além disso, neste mesmo estudo, os autores relataram que NO₂-FA promovem modificações pós-traducionais em proteínas. Por exemplo, a formação de adutos covalentes de lípides nitrados também foi descrita com a proteína gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH), resultando em inibição de sua atividade bem como modificação de sua localização subcelular (Batthyany *et al.*, 2006).

A modulação da transativação do fator de transcrição NF-κB também foi demonstrada com o tratamento com NO₂-FA (Cui *et al.*, 2006). O fator de transcrição NF-κB pode atuar como um hetero ou homodímero de cinco subunidades diferentes (p50, p52, p65, p100 e p105). O dímero formado pelas subunidades p50 e p65 promove em particular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular e progressão de processos inflamatórios. Estudos recentes demonstram que os NO₂-FA podem nitroalquilar a subunidade p65 de NF-κB impedindo a ligação do fator de transcrição à região promotora de genes pró-inflamatórios. Desse modo, o tratamento com OANO₂ e LNO₂ inibiu a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e células endoteliais induzida por TNFα e LPS (Cui *et al.*, 2006).

1.7.3.3 Lípides nitrados como ligantes de PPAR

Em concentrações fisiológicas, os nitrolípides são apontados como ligantes de alta afinidade para PPARγ, e agonistas em menor extensão de PPARα e PPARβ (Alexander *et al.*, 2009;Schopfer *et al.*, 2005a). Desse modo, podem modular eventos de sinalização dependentes da ativação destes receptores, incluindo adipogênese e expressão de CD36 em macrófagos. Experimentos realizados com pré-adipócitos demonstraram que o LNO₂ e o OANO₂ induzem a expressão de PPARγ1 e 2, aP2 e CD36 bem como aumentam a captação de glicose e a diferenciação à adipócitos (Schopfer *et al.*, 2005a).

O mecanismo proposto pelo qual os NO₂-FA ativam PPAR é que estes compostos atuam como ligantes diretos destes receptores se ligando ao domínio LBD, *ligand binding domain*, via pontes de hidrogênio entre os resíduos de arginina e glutamina do domínio com o grupo nitro do lípide nitrado. As pontes de hidrogênio formadas entre os NO₂-FA e os aminoácidos no domínio de ligação estabilizariam o complexo ligante/receptor e conseqüentemente ativariam o PPAR_γ (Li *et al.*, 2008).

1.7.3.4 Atividade antiinflamatória dos lípides nitrados

Os lípides nitrados podem ainda modular rotas de sinalização celular de processos inflamatórios, inibindo a ativação de neutrófilos, o que levaria a geração reduzida de superóxido, mobilização reduzida de cálcio e expressão diminuída de integrina (Coles *et al.*, 2002a). O LNO₂ pode ainda inibir a ativação de trombina das plaquetas via um mecanismo dependente de cAMP, efeito considerado como protetor vascular (Coles *et al.*, 2002b).

Evidências recentes demonstram que os NO₂-FA também podem inibir a expressão da molécula de adesão VCAM-1, resultando por fim na diminuição do *rolling* e adesão de monócitos e na inibição da infiltração de monócitos em cultura de células (Cui *et al.*, 2006). Este efeito também foi confirmado recentemente em um modelo *in vivo* de microscopia intravital (Faine *et al.*, 2009). Além disso, neste estudo os autores sugerem que o efeito antiinflamatório do lípide nitrado testado (LNO₂) seria resultante da expressão diminuída das moléculas de adesão β2-integrina e VCAM-1, bem como nitrosação de CD40.

O papel antiinflamatório de NO₂-FA é ainda apontado por estudos que demonstram que o tratamento com OANO₂ e LNO₂ inibiu a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e células endoteliais induzida por TNFα e LPS (Cui *et al.*, 2006;Ferreira *et al.*, 2009). Em uma linhagem de macrófagos o tratamento com LNO₂ e OANO₂ inibiu a secreção induzida por LPS de interleucina-6, TNFα e MCP-1 (Cui *et al.*, 2006). Outros relatos também demonstram que o AANO₂ inibe a formação de 'NO induzida por LPS e IFNγ, com produção diminuída de 'NO resultante da inibição da expressão de óxido nítrico sintase (Trostchansky *et al.*, 2007).

Os NO₂-FA também inibiram a fosforilação induzida por LPS do sinalizador próinflamatório e ativador de transcrição STAT, inibindo conseqüentemente a expressão de
genes alvos, tais como NOS2 e MCP-1 (Ichikawa *et al.*, 2008). Por sua vez, a expressão da
proteína heme oxigenase-1 (HO1) foi induzida pelo tratamento com LNO₂ em células de
artérias humanas (Wright *et al.*, 2006). A expressão aumentada de HO-1 induzida por NO₂FA também foi descrita em macrófagos (Cui *et al*, 2006), células epiteliais pulmonares e em
modelo *in vivo* sendo a cascata de sinalização de MAPK apontada como mecanismo da
indução de HO-1 (Iles *et al.*, 2009).

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Os lípides nitrados são produtos da nitração de ácidos graxos poliinsaturados com espécies reativas de nitrogênio. Descritos inicialmente in vitro (O'Donnell et al., 1999) e detectados posteriormente in vivo (Baker et al., 2005), os NO2-FA são atualmente apontados como uma nova classe de mediadores lipídicos de sinalização celular (Baker et al., 2009). Além disso, níveis de nitrolípides totais estão aumentados no plasma de pacientes hipercolesterolêmicos após o processo de isquemia-reperfusão (Nadtochiy et al., 2009). Dados recentes demonstram que os derivados da nitração do ácido oléico (nitro-oleato, OANO₂) e do ácido linoléico (nitrolinoleato, LNO₂) possuem capacidade pluripotente de sinalização celular podendo atuar como moléculas antiinflamatórias (Faine et al., 2009; Coles et al., 2002a e 2002b; Cui et al., 2006; Wright et al., 2006) e vasodilatadoras (Lima et al., 2005; Lim et al., 2002) . Esses efeitos são principalmente mediados via reações eletrofílicas (Batthyany et al. 2006) ou ainda via liberação de óxido nítrico das moléculas dos NO₂-FA (Lima et al., 2005; Schopfer et al., 2005b), sugerindo que essas moléculas poderiam atuar como doadores endógenos de óxido nítrico. No entanto, os efeitos dos lípides nitrados permanecem desconhecidos em outros processos fisiopatológicos. A angiogênese é o processo fisiológico de crescimento vascular a partir de vasos pré-existentes que pode contribuir para a patogênese de uma grande diversidade de condições clínicas (Carmeliet, 2005). Mediadores distintos são descritos como moduladores do processo de angiogênese (Hanahan e Folkman, 1996), dentre eles o óxido nítrico (Fukumura et al., 2006). Desse modo, o objetivo geral desta tese de doutorado foi investigar os efeitos dos nitrolípides, LNO₂ e OANO₂, sobre o processo de angiogênese, como também os mecanismos envolvidos nestes efeitos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos estabelecidos foram:

- 1. Avaliar os efeitos dos nitrolípides sobre a viabilidade e proliferação celular em cultura de células endoteliais;
- 2. Investigar os efeitos dos lípides nitrados na migração de células endoteliais;
- 3. Utilizar o modelo ex vivo de cultura de anel de aorta de rato e o modelo in vivo de membrana corioalantóica de embrião de galinha para verificar os efeitos dos lípides nitrados no processo angiogênico;
- 4. Elucidar os efeitos dos lípides nitrados demonstrados sobre o processo de angiogênese, caracterizando os mecanismos regulatórios responsáveis.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Ácido linoléico, acido oléico, tetrafluoroborato de nitrônio, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3oxido, (c-PTIO), dimetilsulfóxido (DMSO) e anticorpo anti-actina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). LNO2 foi sintetizado no laboratório de Bioquímica Clinica (FCF-USP). Os reagentes para isolamento, purificação e caracterização de LNO2 foram obtidos da empresa Merk (Darmstadt, Alemanha). OANO2 foi adquirido de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Os meios de cultura RPMI 1640, MEM, MCDB131 e DMEM alta glicose, soro fetal bovino e suplementos para cultura celular foram obtidos da empresa GIBCO BRL – Life Tecnologies. Os reagentes utilizados para a extração de RNA bem como para a reação de transcrição reversa foram adquiridos da empresa Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EUA). Os reagentes para reações de real time PCR foram adquiridos da Applied Biosystems. O anticorpo anti-HIF1α foi obtido da empresa BD Biosciences (Heidelberg, Alemanha). Os reagentes para Western Blot foram obtidos da empresa Amersham Bioscience. O kit para determinação por ELISA de VEGF foi adquirido da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). O kit para determinação de proteína pelo método de BCA foi obtido da empresa Pierce (Rockford, IL, EUA). O colágeno tipo I de cauda de rato foi gentilmente cedido pela Profa Dra Silvya Stuchi Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP).

3.1.2 Cultura celular e transfecção

3.1.2.1 Células

Para a realização desse trabalho foram utilizadas células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) obtidas do American Type Culture Collection e células endoteliais da linhagem celular EA.hy926, que foram gentilmente cedidas pela Dr. Cora-Jean Edgell, da University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina. Essa linhagem celular foi estabelecida pela fusão de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) com células de carcinoma humano (linhagem A549).

3.1.2.2 Transfecção lentiviral de células endoteliais.

Para criar células EAhy926 *knockdown* estáveis para o gene HIF-1α, a técnica de RNA de interferência foi utilizada. O sistema utilizado foi o sistema MIssion shRNA (Sigma, Taufkirchen, Alemanha). Inicialmente os plasmídios lentivirais contendo a seqüência do gene de interesse foram "empacotados" com plasmídios de empacotamento compatíveis por células HEK293T de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídios lentivirais sem a seqüência do gene de interesse também foram utilizados. Esse empacotamento gerou plasmídios com partículas virais inativas que foram secretadas no meio de cultura. Em seguida células da linhagem EA.hy926 foram infectadas e os clones de EA.hy926 transduzidos foram selecionados com meio de cultura DMEM alta glicose com 10 % soro fetal bovino (SFB) contendo 5 μg/mL de puromicina. A eficiência do silenciamento do gene HIF-1α foi confirmado por *real-time PCR* e *Western Blot*.

3.1.2.3 Condições de cultura

As células endoteliais HUVEC foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio 2,0 g/L, estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% SFB inativado. As células EA.hy926 e as EA.hy926 *knockdown* para HIF-1α foram mantidas em meio DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 UI/mL e hipoxantina, aminopterina e timidina. As células foram incubadas a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em todos os experimentos de indução as células foram incubadas com meio RPMI 1640 ou DMEM de alta glicose suplementado com 1% de SFB.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de LNO₂

A nitração do ácido linoléico foi realizada segundo método descrito por Lima *et al.* (2002), com algumas modificações. Inicialmente, uma espátula pequena de tetrafluoroborato de nitrônio (NO₂BF₄) foi adicionada a 200 mg de ácido linoléico em 1 mL de clorofórmio e agitado em gelo durante 5 min. A seguir, a reação foi bloqueada pela adição de 2 mL de água MiliQ e em seguida extraída com 5 mL de éter dietílico, onde a fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em 1 mL de acetonitrila para subseqüente isolamento e purificação do LNO₂.

3.2.2 Isolamento e purificação de LNO₂

O isolamento e purificação de LNO₂ foram realizados com cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C18 de fase reversa 250 x 10 mm, sob fluxo de 4 mL/min, usando como fase móvel um gradiente de 60-100% de acetonitrila/água. Os picos foram monitorados por UV, coletados e analisados por LC/ESI/MS.

3.2.3 Caracterização química do LNO₂

As frações coletadas na purificação realizada por HPLC foram caracterizadas por espectrometria de massa com sistema de ionização da amostra por electrospray. Os experimentos foram realizados, em espectrômetro Íon Trap (Esquire HCY, Bruker Daltonics, MA, USA) operado em modo negativo no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Para a realização das análises dos picos coletados, as amostras foram diluídas em metanol/água 1:1 e foram introduzidas na fonte de impacto de elétrons via bomba difusora (Cole-Parmer, IL, USA) a um fluxo de 5 μL/min. As análises foram realizadas utilizando nitrogênio como gás nebulizador (15 psi) e hélio como gás tampão (4x10⁻⁶ mbar). A maior voltagem capilar foi ajustada para 3000 V. Nesta análise foram utilizados os seguintes modos: varredura total do scan (full scan) de m/z 50 a 700, SIR para íons de m/z 324 e 279, íons filho para m/z 324 e multiple reaction monitoring (MRM) selecionando o íon de m/z 324 para o produto nitrado. No sistema ESI/MS/MS foi utilizado uma energia de colisão entre 0,2 e 0,3 V.

Após caracterização, as frações puras de LNO₂ sofreram extração com 20 mL de éter dietílico, onde a fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em etanol e armazenado em freezer –80°C até subseqüente uso.

3.2.4 Análise de viabilidade celular

Brevemente, 1x10⁴ células/poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços a um volume inicial de 50 μl. Após 3h de incubação a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, para permitir a aderência celular, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 com 1% de SFB e as células foram incubadas *overnight*. Em seguida, 100 μl de meio RPMI 1640 com 1% de SFB contendo concentrações variadas (0,001 – 10 μM) de OANO₂, OA, LNO₂ ou LA foram adicionados. Concentrações equivalentes do veículo (etanol) presente nos poços tratados também foram testadas. A maior concentração de etanol presente foi de 0,1% v/v. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi removido através de inversão da placa e 50 μl de uma solução de MTT 1 mg/ml em meio RPMI livre de vermelho de fenol foi adicionado e as placas foram agitadas por 3h a temperatura ambiente. Ao término deste tempo, o MTT não reduzido foi removido através de inversão da placa e 100 μl de DMSO foi adicionado em cada poço. As placas foram vigorosamente agitadas, para completa solubilização do produto formazan, e a densidade ótica de cada poço foi determinada em um leitor de elisa a 570 nm.

3.2.5 Análise de proliferação em células endoteliais

Primeiramente as células endoteliais foram tripsinizadas e contadas. Logo após, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em PBS pré-aquecido. Diacetato de carboxifluoresceína-succinimidil ester (CFSE, 5 mM- Molecular Probes) diluído em DMSO 0,1% foi adicionado e as células endoteliais foram incubadas em banho-maria a 37°C por 40 min. Meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino foi adicionado e as células foram novamente centrifugadas, ressuspendidas em meio de cultura e incubadas a 37°C por 30 min. Após este tempo, as células foram finalmente centrifugadas, ressuspendidas, plaqueadas e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ por 6h para permitir a aderência celular. Em seguida, o meio

de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 1% e as células foram incubadas *overnight*. Veículo (etanol 0,1% v/v), LNO₂ 10 μM ou LA 10 μM foram então adicionados e as células foram incubadas com os tratamentos durante 2h. Após a incubação, o meio de cultura foi substituído por RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e a proliferação das células endoteliais tratadas foi monitorada 24, 48 e 72h após o tratamento através de citometria de fluxo com o auxilio do programa CellQuest. Os dados foram analisados no programa FlowJo.

3.2.6 Análise da migração celular

O ensaio de migração celular de células endoteliais foi realizado de acordo com o modelo de cicatrização *in vitro* estabelecido por Burk (1973). Inicialmente, 1 x 10⁵ células foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após as culturas tornarem-se confluentes uma fenda na monocamada foi realizada com o auxílio de uma microponteira de 200 μL estéril. As células foram lavadas com PBS gelado e meio RPMI 1640 com 1% de SFB contendo concentrações variadas (0,001 – 10 μM) de OANO₂, OA, LNO₂ ou LA foi adicionado. A incubação com o veículo (etanol) na maior concentração (0,1% v/v) presente nos grupos tratados também foi realizada. Imediatamente após a criação da fenda na monocamada celular e ao final do experimento (após 24h) as células foram fotografadas e o programa AxioVision 4.0 foi utilizado para determinar a migração de células controle e células tratadas. O número de núcleos celulares na área da fenda foi quantificado em 3 campos microscópios distintos representativos de cada cultura celular.

3.2.7 Análise de angiogênese em modelo ex vivo.

Para a análise dos efeitos dos nitrolípides no processo angiogênico, foi empregado o modelo ex vivo de cultura de anel de aorta de rato conforme descrito previamente (Nicosia e Ottinetti, 1990). Este modelo é considerado o modelo experimental ex vivo que melhor mimetiza o processo de neovascularização in vivo, pois inclui na cultura celular não apenas células endoteliais, mas também células vasculares de músculo liso, pericitos e uma matriz suporte. Além disso, as células endoteliais não estão proliferando no momento que são colocadas em cultura, o que novamente representa a situação in vivo onde o processo de angiogênese é iniciado e células endoteliais quiescentes tornam-se proliferativas, migram de vasos pré-existentes e diferenciam-se em túbulos.

Primeiramente, as aortas torácicas foram removidas de ratos Wistar machos de 2 a 3 meses de idade. Em seguida o tecido fibroadiposo peri-aórtico foi cuidadosamente removido, as aortas foram cortadas em intervalos de 1 mm e os anéis de aorta resultantes foram lavados em meio de cultura MCDB131 estéril gelado. Os anéis aórticos foram transferidos para uma placa de 48 poços (1 anel por poço) contendo 0,1 mL de uma solução de colágeno tipo I extraído de cauda de rato (1,5 mg/mL) já polimerizado. A matriz de suporte foi preparada com uma solução contendo 7,5 volumes de colágeno tipo I de cauda de rato (2 mg/mL), 1 volume de MEM 10x, 1,5 volume de NaHCO₃ e aproximadamente 0,1 volume de NaOH. Adicionou-se então mais 0,1 mL da solução de colágeno sobre o anel aórtico. Após completa polimerização da solução de colágeno, 1,2 mL de MCDB131 suplementado com NaHCO₃ 25 mM, 1% de L-glutamina, estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina 0,25 µg/mL contendo etanol (0,1% v/v), OANO2, OA, LNO₂ ou LA foi adicionado. As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO2 durante 6 dias. No sexto dia, as culturas de anéis de aorta foram examinadas em microscópio invertido com sistema de imagem acoplado. A análise de imagem foi realizada com auxílio do programa AxioVision 4.5, onde os brotamentos provenientes dos anéis de

aorta foram contados e seus comprimentos quantificados. Os dados são expressos como comprimento total dos brotamentos.

3.2.8 Análise de angiogênese em modelo in vivo

Para este ensaio forma utilizados ovos embrionados de galinha (Gallus gallus). Os ovos embrionados foram incubados a 37°C e 65% de umidade relativa. No terceiro dia de vida uma "janela" foi aberta na casca do ovo e aproximadamente 3 mL de albumina foram retirados com o auxilio de uma seringa estéril. Logo após, esta "janela" foi fechada com fita adesiva e os embriões foram incubados a 37°C e 65% de umidade relativa até o 8° dia de idade, quando foram implantados papéis de filtro nº 1 (Whatman) embebidos em veículo (etanol 0,1%), OANO2, OA, LNO2 ou LA na concentração de 10 μM. As soluções foram administradas topicamente nos papéis de filtro nos dias subsegüentes (9 e 10). No 11º dia de incubação dos embriões, foi realizada a fixação das membranas corioalantóica dos embriões de galinha (CAMs) com para-formaldeído 10% e a retirada dos papéis de filtro juntamente com a CAM contida abaixo do mesmo. O material obtido foi lavado com PBS gelado e colocado de modo invertido em uma placa de cultura contendo PBS para demonstração do tecido contido abaixo do filtro. A aquisição das imagens foi procedida com o auxílio de câmera fotográfica (Câmera DS-u1) acoplada à lupa estereoscópica (Lupa Nikon SMZ1800) e do programa de captação de imagens ACT-2U. A análise das imagens obtidas foi realizada de modo "cego" com o auxílio do programa AxioVision 4.0.

3.2.9 Extração de RNA total

RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) segundo especificações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e considerados de boa qualidade os RNAs que

apresentaram uma razão da absorbância 260/280nm com valores próximos de 2. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose-formaldeído.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

3.2.10 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 μ g de RNA total e um mix contendo oligo dT₁₂₋₁₈ (0,5 μ g/ μ L), dNTP mix (10 mM) e RNAsin (40U/ μ L), Superscript III (200 U/ μ L), bem como DTT (0,1M) e 1st strand buffer (5X). Os tubos foram incubados por 5 min a 65°C, 120 min a 50° C e 5 min a 95°C. Após a reação, os tubos foram colocados imediatamente em gelo e armazenados a -20°C.

3.2.11 Quantificação dos níveis de expressão gênica

3.2.11.1 Desenho dos primers

Após a escolha dos genes que seriam avaliados, a seqüência dos cDNAs desses genes foram obtidas no *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e *Ensembl Genome Browser* (http://www.ensembl.org). Os primers específicos para os genes de interesse e para os genes normalizadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu). Os primers selecionados possuíam 18-22 nucleotídeos, conteúdo de G/C aproximado de 50%, temperatura de anelamento entre 58-60°C, além de não conter mais de 2 Gs ou Cs na extremidade 3' e o tamanho do fragmento resultante permanecer entre 50 e 150 bp. Além disso, os primers *Sense* e *Antisense* localizavam-se em éxons distintos e possuíam uma diferença máxima de 2°C em suas temperaturas de anelamento.

Depois de desenhados, a especificidade dos primers foi testada através do programa BLAST disponível no site do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) e sintetizados sob encomenda pela empresa Invitrogen. Após recebidos no laboratório, os primers foram solubilizados em água de MiliQ estéril e armazenados em freezer -20°C. Os primers selecionados estão listados na Tabela 1.

Gene	Primer Sense	Primer Antisense
VEGF	5'-ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC-3'	5'-CAAGGCCCACAGGGATTTTC-3'
FGF2	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
PDGFBB	5'-TTCCCGAGGAGCTTTATGAG-3'	5'-GGGTCATGTTCAGGTCCAA-3'
MMP2	5'-CCCAAAACGGACAAAGAGTT-3'	5'-TGGTCTCGATGGTATTCTGG-3'
MMP9	5'-GAACTTTGACAGCGACAAGAAG-3'	5'-CAGTGAAGCGGTACATAGGG-3'
HIF-1 α	5'-GCTGGCCCCAGCCGCTGGAG-3'	5'-GAGTGCAGGGTCAGCACTAC-3'
Ciclofilina	5'-ATGGTCAACCCCACCGTGT-3'	5'-TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC-3'
18SrRNA	5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

Tabela 1. Sequência de primers utilizados

Foram ainda utilizados primers para os genes de VEGFR1 e VEGFR2 obtidos da Qiagen (Hilden, Alemanha).

3.2.11.2 Reação de real time PCR

Para as reações de *real time PCR* (qRT-PCR) foram utilizados 0,5 μ L de cDNA, 1 μ L da mistura de um dos pares de primers *forward* e *reverse* de cada gene citado anteriormente, 11 μ L de água miliQ estéril e 12.5 μ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O ensaio qRT-PCR foi realizado no aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes das reações de *real-time PCR* foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct (ΔΔCt) (Livak e Schmittgen, 2001).

3.2.12 Detecção da expressão de proteínas

3.2.12.1 Western Blot

A análise de *Western Blot* foi realizada conforme descrita previamente por Metzen e colaboradores (2003). Brevemente, as células tratadas sob diferentes condições experimentais foram lavadas rapidamente com PBS gelado e lisadas com 50 μL de tampão de lise contendo uréia 6.65M (uréia 6.65M/ glicerol 10%/ SDS 1%/ Tris 10 mM pH 6.8).As amostras foram sonicadas, centrifugadas (15000 x g, 15 min) e a concentração de proteínas foi determinada através do método de BCA. Em seguida, 100 μg de proteína total foi adicionado ao tampão de amostra SDS-PAGE (Tris 0.1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 2%) e aquecida a 95° C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS e foram submetidas à carga elétrica – 2h a 100 V – para a realização da eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seco – 105 min a 0.07A/membrana. Sítios de ligação inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução de leite 5% em TBS-T por 2h a temperatura ambiente. Logo em seguida, a membrana foi lavada 1X com TBS-T e mais 2X com TBS. O anticorpo anti- HIF-1α (1:1000 em 5% de leite/TBS-T) foi adicionado e incubado

overnight a 4°C sob agitação suave. Novamente as membranas foram lavadas 1X com TBS-T e mais 2X com TBS.

As membranas foram então incubadas com anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase (1:2000 em 5% de leite/TBS-T) por 1h, lavadas 1X com TBS-T e mais 2X com TBS seguida de detecção realizada pelo método de quimioluminescência utilizando o kit ECL™ (GE Healthcare), conforme especificações sugeridas pelo fabricante.

3.2. 12.2 Determinação de proteína por ELISA

A quantificação de VEGF em meio de células HUVEC foi realizada usando o kit de imunoensaio Quantikine (R&D Systems) conforme instruções do fabricante. Inicialmente, 100 μL do diluente fornecido foi adicionado em cada poço da microplaca. Em seguida, 200 μL de meio condicionado obtido de células tratadas por 24h por diferentes condições foi adicionado a cada *well* da microplaca e a mistura foi homogeinizada. A placa foi então coberta com um adesivo e incubada por 2h a temperatura ambiente. Cada poço teve seu conteúdo aspirado e o poço foi lavado 4 vezes com 400 μL de tampão de lavagem. 200 μL do conjugado de VEGF foram adicionados a cada poço e a placa foi novamente incubada por mais 2h a temperatura ambiente. Ao término desta incubação, novamente a lavagem foi realizada. Em seguida, 200 μL de solução de substrato foi adicionada a cada well e a placa foi incubada por 30 min adicionais a temperatura ambiente protegida da luz. Por fim, a reação foi parada pela adição de 50 μL de uma "stop solution" e a densidade óptica foi determinada em leitor de elisa a 450 nm. Os valores de VEGF foram medidos como pg/mL de acordo com os padrões fornecidos pelo fabricante e corrigido pelo valor de proteínas totais determinado pelo método de BCA.

3.2.12.3 Protein array

Com a finalidade de determinar os efeitos do tratamento com LNO₂ e LA sobre a secreção de proteínas pró- e anti-angiogênicas em células endoteliais HUVEC foi empregado o kit RayBio[®] Human Angiogenesis Antibody Array C Series 1000. Este kit foi escolhido devido sua grande sensibilidade e por possibilitar a avaliação simultânea de 43 proteínas pró e anti-angiogênicas em um único ensaio. O princípio da técnica deste kit é baseado no princípio de imunoensaios do tipo sanduíche, onde anticorpos específicos encontram-se imobilizados em uma membrana que é exposta a amostra a ser testada. As citocinas da amostra são capturadas pelos anticorpos e detectadas por um coquetel de anticorpos biotinilados. Posteriormente, um anticorpo secundário conjugado a estreptavidina é adicionado. Por fim, os sinais podem ser visualizados utilizando quimioluminescência.

Para este ensaio, 2x10⁶ células endoteliais foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 com 1% SFB contendo diferentes tratamentos por 24h a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após 24h de incubação, 1 mL do meio condicionado foi incubado com as membranas, previamente bloqueadas, por 2 h conforme instruções do fabricante. Logo após, as amostras foram retiradas e as membranas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem a temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, uma mistura de anticorpos primários biotinilados foi adicionada às membranas e incubada por 2h. Novamente as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem a temperatura ambiente sob agitação e o anticorpo secundário conjugado à estreptavidina foi adicionado às membranas. Após incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem a temperatura ambiente sob agitação. As proteínas foram então detectadas utilizando o tampão de detecção fornecido pelo fabricante e os sinais foram capturados em filmes de raio-X.

3.2.13 Avaliação da atividade de metaloproteases

Nesse trabalho, a zimografia foi empregada para a determinação dos efeitos de NO₂-FA sobre a atividade das metaloproteinases -2 e -9 (MMP-2 e MMP-9) conforme descrito previamente (Leber e Balkwill, 1997). A técnica de zimografia é sensível e quantificável, na qual a atividade de uma enzima específica ou uma classe de enzimas pode ser detectada em uma mistura de proteínas após a separação eletroforética em uma matriz de substrato (Heussen e Dowdle, 1980). Primeiramente, 1 x 10⁵ células foram incubadas com diferentes condições experimentais em meio de cultura RPMI 1640 sem soro por 24h a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após 24h de incubação, o meio condicionado foi coletado e concentrado em speed vac e a concentração de proteínas foi determinada através do método de BCA. Em seguida, 100 µg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE de 10% de acrilamida contendo 0,2% de gelatina a uma voltagem constante de 100 V em ambiente refrigerado. Após a separação das proteínas, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% a temperatura ambiente por 30 min para remover o SDS e permitir a renaturação das proteases. Em seguida, a solução de Triton foi descartada e o gel foi incubado em tampão de revelação contendo 50mM de Tris pH 8.8, 10 mM CaCl₂ e 0,15 M de NaCl por 40h. Após a incubação em solução reveladora, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 por 3h e descorado em solução descorante. Finalmente, o gel foi escaneado e a densitometria das bandas foi determinada através do programa Image J.

3.2.14 Análise estatística

Todos os dados numéricos estão apresentados como média ± desvio padrão (D.P.)

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram conduzidos por no mínimo três vezes. A significância estatística foi avaliada através da análise de variância (ANOVA)

para um fator, seguido do teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 8.0 (Chicago – II), com nível α de significância de 5% (bicaudal).

4.0 Resultados

4.1 Síntese e caracterização de LNO₂

LNO₂ foi sintetizado através da adição do grupo nitro (NO₂⁺) proveniente da reação entre o LA e NO₂BF₄. No entanto, como demonstrado na Figura 3, além da formação de LNO₂ a presença de diversos outros produtos da nitração e oxidação do ácido linoléico foi detectada.

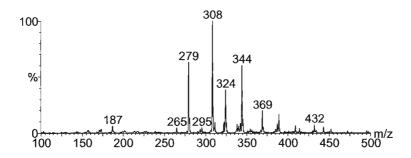


Figura 3. Espectro de massa dos produtos de reação entre LA e NO₂BF₄.

Portanto, o resíduo resultante da reação entre LA e NO₂BF₄ foi ressuspendido em acetronitrila e o LNO₂ foi purificado por HPLC em coluna C18 de fase reversa 250 x 10 mm, sob fluxo de 4 mL/min, usando como fase móvel um gradiente de 60-100% de acetonitrila/água. Os picos foram monitorados por UV, e os picos resolvidos por separação por HPLC apresentando tempos de retenção entre 40-43 min foram coletados e analisados por LC/ESI/MS. Apenas os picos que demonstraram espectro único de m/z=324 na análise de espectrometria de massa tipo varredura total do scan (*full scan*) de m/z 50 a 700 (como ilustrado na Figura 4) foram caracterizados e extraídos.

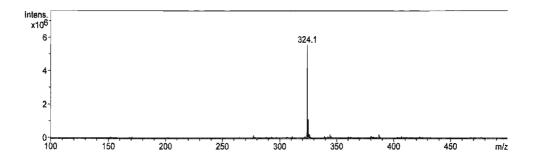


Figura 4. Espectro de massa de um pico resolvido por HPLC e analisado por LC/ESI/MS. A análise realizada foi do tipo varredura total do scan (*full scan*) de m/z 50 a 700 em espectrômetro de massa Íon Trap operado em modo negativo.

Os picos que apresentaram espectro de massa único de m/z=324 foram caracterizados por meio de análise MS/MS em LC/ESI/MS. A análise MS/MS do LNO₂ sintetizado revelou os fragmentos de m/z= 157, 196, 233, 244, 277, 293 e 306 (Figura 5). Após compararmos o perfil de fragmentação obtido com dados presentes na literatura podemos constatar que o produto de nossa síntese era o isômero C12 do ácido linoléico nitrado, ou seja, o ácido 12-nitro-9-cis-octadecadienóico.

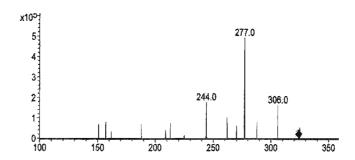


Figura 5. Caracterização por LC/ESI/MS do LNO₂.

Inicialmente esta tese objetivava investigar apenas os efeitos do LNO₂ sobre o processo de angiogênese, um lípide nitrado que sintetizamos e caracterizamos em nosso laboratório, conforme descrito nas seções anteriores. No entanto, com o advento da disponibilidade comercial de OANO₂ no final de 2007, este outro lípide nitrado foi incorporado ao trabalho em junho de 2008 como molécula comparativa.

4.2 LNO₂ e OANO₂ não alteram a viabilidade celular de células endoteliais

Primeiramente, os efeitos de concentrações variadas de LNO₂ e OANO₂ e suas moléculas precursoras, LA e OA sobre a viabilidade celular de células endoteliais foram determinados com o método de MTT como descrito previamente por (Denizot e Lang, 1986).

A incubação de células HUVEC por 24h com concentrações diversas $(0,001-10~\mu\text{M})$ de LNO $_2$ não demonstrou qualquer efeito significante na viabilidade celular quando avaliada pelo método de MTT. O mesmo resultado foi constatado com o tratamento de diversas concentrações $(0,001-10~\mu\text{M})$ de LA e concentrações equivalentes de etanol (Figura 6A).

Similarmente, o tratamento com diferentes concentrações de $OANO_2$ (0,001 – 10 μ M) ou sua molécula precursora, OA, não afetou a viabilidade das células endoteliais quando comparado com células do grupo não tratado (Figura 6B).

Por fim, a incubação das células endoteliais EA.hy926 com a concentração mais alta (10 μM) de todos os compostos também não demonstrou qualquer efeito significativo sobre a viabilidade celular, conforme demonstrado na figura 6C. Neste experimento um controle positivo com 10% de soro também foi testado.

Resultados

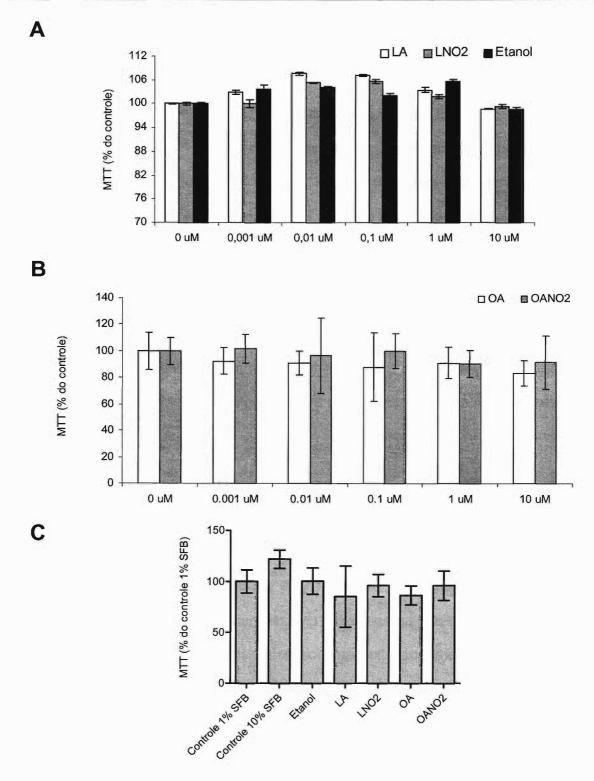


Figura 6. Efeitos do tratamento de LNO $_2$, LA, OA, OANO $_2$ ou etanol na viabilidade celular. Na figura (A) a representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de LNO $_2$, LA e etanol sobre a viabilidade de células endoteliais HUVEC; (B) a representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de OANO $_2$, e OA sobre a viabilidade de células endoteliais HUVEC; (C) Efeitos do tratamento com 10 μ M de LNO $_2$, LA, OA, OANO $_2$ ou etanol na viabilidade de células endoteliais EA.hy926. As células endoteliais receberam concentrações diversas (0,001 – 10 μ M) de LNO $_2$, LA, OA, OANO $_2$ e foram incubadas por 24 h. Concentrações equivalentes ao volume de etanol (0 – 0,1% v/v) presente nas células tratadas também foram testadas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT em células HUVEC como descrita anteriormente. Os dados estão expressos como média \pm D.P. (n=9).

4.3 LNO₂ não altera a proliferação de células endoteliais

Após a constatação de que o tratamento com concentrações variadas de LNO₂ não altera a viabilidade de células endoteliais, os efeitos do LNO₂ sobre a proliferação celular foram avaliados por citometria de fluxo. A marcação celular foi realizada com CFSE, as células endoteliais foram incubadas por 1h com etanol 0,1% (controle), LA ou LNO₂ 10 μM e a proliferação celular foi analisada por citometria de fluxo nos tempos 0, 24, 48 e 72h.

Nesse ensaio, o CFSE entra por difusão passiva nas células e, após ser clivado pelas esterases intracelulares, reage com aminas celulares formando conjugados que são retidos nas células durante o desenvolvimento e a meiose. Desse modo, uma diminuição da fluorescência, a qual é correlacionada à divisão celular de células em estado proliferativo, é observada ao longo do tempo.

As análises foram realizadas com o auxilio do programa FlowJo, onde apenas um gate de células vivas foi avaliado. As células marcadas no tempo 0h serviram como um controle de fluorescência inicial (Figura 7A). Ao examinarmos as células marcadas com CFSE e tratadas com LNO₂ 10 μM e LA 10 μM observarmos que as células estavam em estado proliferativo, pois apresentaram uma diminuição na fluorescência ao longo do tempo. Contudo, ao compararmos à fluorescência demonstrada pelas células controles, verificamos que tanto o tratamento com LNO₂, bem como com LA não alteraram de maneira significativa a proliferação das células endoteliais como pode ser observado na Figura 8.

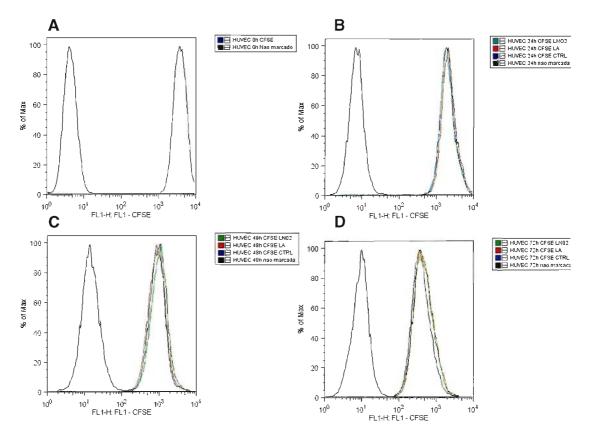


Figura 7. Análise da proliferação celular com marcação com CFSE. As células endoteliais foram marcadas com CFSE e incubadas com etanol 0,1% (controle), LA 10 μ M ou LNO₂ 10 μ M por 1h e analisadas 0h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após o tratamento.

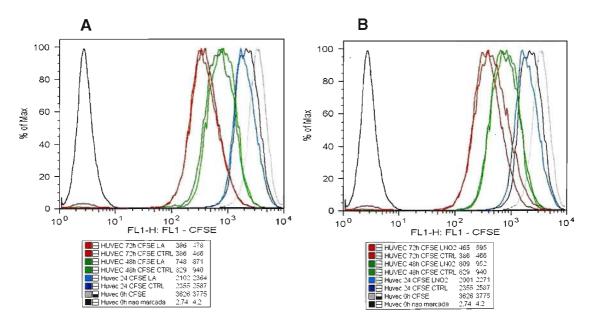


Figura 8 Cinética da proliferação de células endoteliais marcadas com CFSE. As células foram tratadas com LA 10 μ M (A) ou LNO $_2$ (B) quando comparado ao grupo controle. Na legenda são apresentadas as médias e medianas das triplicatas do ensaio.

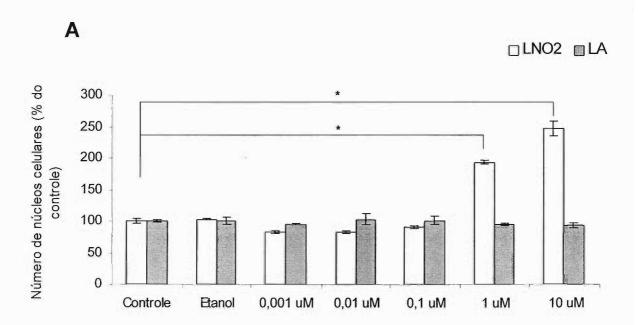
4.4 LNO₂ e OANO₂ induzem a migração de células endoteliais

Em seguida, os efeitos de LNO₂ e OANO₂ sobre a migração de células endoteliais foram averiguados utilizando-se o ensaio de cicatrização *in vitro*. Conforme demonstrado na Figura 9, o tratamento com LNO₂ (1 – 10 μM) aumentou a migração celular em 1,9 e 2,5 vezes na área da fenda quando comparado ao grupo controle. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao compararmos entre si os efeitos apresentados nas concentrações de 1 e 10 μM. Além disso, nenhum efeito sobre a migração de células endoteliais foi observado com concentrações menores de LNO₂. Interessantemente, nenhuma concentração do tratamento com LA demonstrou qualquer efeito na migração celular sob nossas condições experimentais (Figura 9A).

O efeito dos tratamentos com OANO₂ e OA (10 μM) sobre a migração de células endoteliais também foi investigado, onde o tratamento com OANO₂ 10 μM estimulou a migração celular. A magnitude do efeito demonstrado foi de 2,1 vezes quando comparado ao grupo controle indicando que lípides nitrados distintos apresentam efeitos semelhantes. Similar a LA, a molécula precursora do ácido nitro-oléico (ácido oléico) não demonstrou qualquer efeito significante na migração de células endoteliais (Figura 9B).

O tratamento com LNO_2 e $OANO_2$ na concentração 10 μ M mostrou efeitos idênticos aos descritos nessa seção quando avaliado utilizando-se a linhagem celular endotelial EA.hy926 (dados não mostrados).

Por conseguinte, esses dados indicam que os NO_2 -FAs na concentração de 10 μ M podem induzir a migração de células endoteliais. Na figura 10, fotos representativas dos efeitos observados pela incubação com etanol, LA (1 – 10 μ M) e LNO $_2$ (1 – 10 μ M) são apresentadas. Por sua vez, na figura 11, os efeitos de OANO $_2$ 10 μ M e OA 10 μ M são ilustrados.





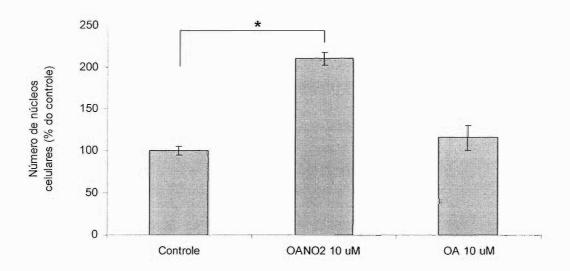


Figura 9. NO_2 -FA induzem a migração endotelial celular. Os dados representam o número de núcleos celulares 24h após lesão física na cultura celular e subseqüente incubação com concentrações diversas de LA e LNO_2 (A) e com $OANO_2$ e OA 10 μ M (B). O número de núcleos celulares na área da fenda foi quantificado em 3 campos microscópios distintos representativos de cada cultura celular. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao grupo controle \pm D.P. (n=9) * P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

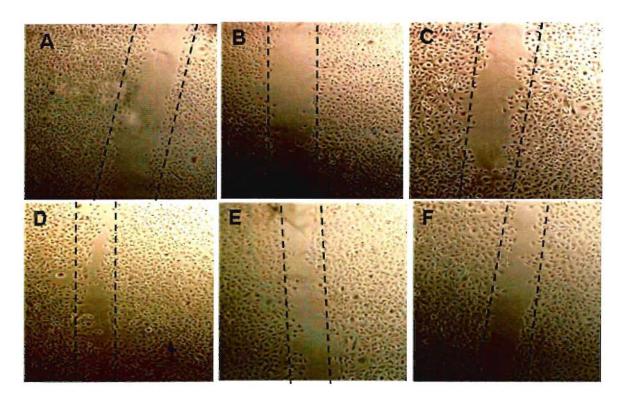


Figura 10. Efeito do tratamento com LA e LNO₂ sobre a migração celular de células endoteliais. As figuras são representativas da incubação dos grupos controle (A), Veículo (etanol 0,1% v/v, B), LNO₂ 1μM (C) LNO₂ 10μM (D), LA 1μM (E) e LA 10 μM (F). As fotos foram tiradas no tempo 6h. As linhas pontilhadas representam as bordas iniciais do corte.

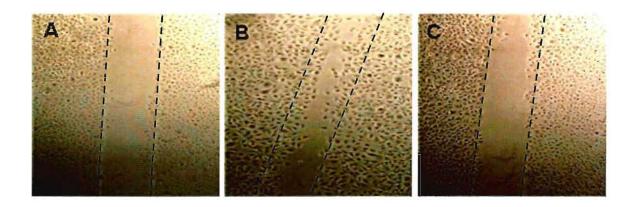


Figura 11. Efeito do tratamento com OA e OANO $_2$ sobre a migração celular de células endoteliais. As figuras são representativas da incubação dos grupos controle (A), OANO $_2$ 10 μ M (B) e OA 10 μ M (C). As fotos foram tiradas no tempo 6h. As linhas pontilhadas representam as bordas iniciais do corte.

4.4.1 A migração celular induzida por LNO₂ e OANO₂ ocorre por mecanismo dependente de *NO

O passo seguinte foi entender como os lípides nitrados estimulavam a migração de células endoteliais. Uma possibilidade é que o efeito observado poderia ser conseqüente da liberação de NO presente na estrutura destes compostos Sendo assim, a participação de NO nos efeitos demonstrados foi determinada. Para tanto, monocamadas de células HUVEC contendo uma fenda foram pré-tratadas com um seqüestrador de óxido nítrico, o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido, (c-PTIO) na concentração de 100 μM por 1h. Em seguida, as células foram estimuladas com LNO₂ 10 μM ou OANO₂ 10 μM por 24h. Ao término da incubação, o número de núcleos celulares que atravessaram a linha demarcada foi quantificado em três campos microscópicos distintos representativos de cada cultura celular.

Na presença do pré-tratamento com c-PTIO 100 μ M a migração celular induzida pela incubação com LNO $_2$ 10 μ M bem como com OANO $_2$ 10 μ M não foi detectada sugerindo que os tratamentos com LNO $_2$ 10 μ M e OANO $_2$ 10 μ M possivelmente regulam a migração celular por mecanismos dependentes de *NO (Figura 12).

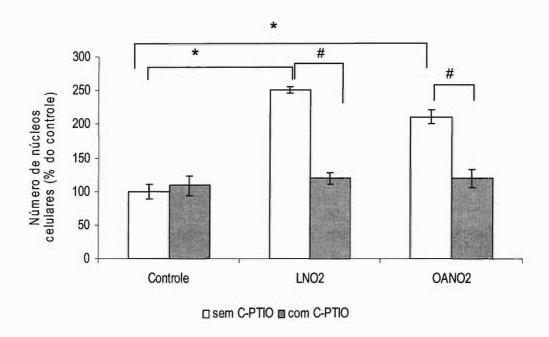


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com c-PTIO (100 μM) sobre a migração celular induzida por LNO $_2$ 10 μM e OANO $_2$ 10 μM. Os dados representam o número de núcleos celulares 24h após lesão física na cultura celular e subseqüente pré-tratamento com c-PTIO (100 μM) e incubação com LNO $_2$ e OANO $_2$. O número de núcleos celulares na área da fenda foi quantificado em 3 campos microscópios distintos representativos de cada cultura celular. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao grupo controle \pm D.P. (n=9) * P<0,05 quando comparado ao grupo controle e # P<0,05 quando comparado ao grupo sem pré-tratamento.

Em seguida, para determinarmos a possível participação do *NO endógeno nos efeitos observados dos tratamentos com os NO₂-FA, o ensaio de migração celular foi novamente repetido com o pré-tratamento das monocamadas de HUVEC contendo uma fenda com o inibidor da óxido nítrico sintase, NG-monometil-L-arginina, (L-NMMA) na concentração de 500 μM. Após 1h de pré-tratamento as células HUVEC foram incubadas com LNO₂ (1-10 μM) ou etanol (0,1% v/v) por 24h. Após 24 horas, o número de núcleos celulares que atravessaram a linha demarcada foi quantificado em três campos microscópicos distintos representativos de cada cultura celular.

O pré-tratamento das nomocamadas de HUVECs contendo uma fenda com L-NMMA 500 μM não demonstrou qualquer efeito significante na migração celular induzida pelo tratamento com LNO₂ (1-10 μM) indicando que o óxido nítrico gerado endogenamente pela

óxido nítrico sintase não contribuiu com o efeito demonstrado pelo tratamento de LNO₂ (1-10 μM) na migração de células endoteliais (Figura 12).

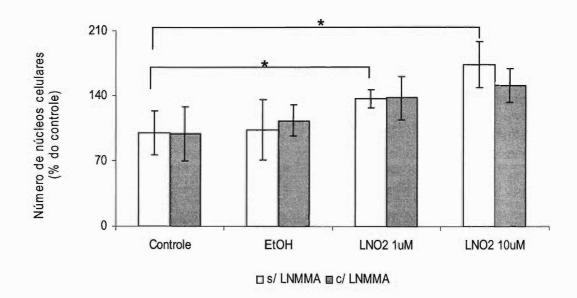


Figura 13. Efeito do pré-tratamento com L-NMMA (500 μM) na migração celular induzida por LNO₂ (1-10 μM). Os dados representam o número de núcleos celulares 24h após lesão física na cultura celular e subseqüente pré-tratamento com L-NMMA (500 μM) durante 1h e incubação com LNO₂ (1-10 μM). O número de núcleos celulares na área da fenda foi quantificado em 3 campos microscópios distintos representativos de cada cultura celular. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao grupo controle \pm D.P. (n=9) * P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Estes resultados, portanto, indicam que o mecanismo empregado pelos NO₂-FA para induzir a migração de células endoteliais é via liberação de *NO. Contudo, o *NO liberado da molécula de NO₂-FA atuaria de modo independente ao *NO endógeno.

4.5 Efeito dos NO₂-FA sobre a angiogênese em modelo ex vivo

Como foi anteriormente demonstrado que os NO₂-FA estimulam uma das etapas do processo de angiogênese, o passo seguinte foi investigar se os NO₂-FA poderiam

demonstrar algum efeito sobre o brotamento de novos vasos em um modelo ex vivo de cultura de anéis de aorta de rato.

Com este objetivo, anéis de aorta de rato foram estimulados inicialmente com diferentes concentrações de LNO₂ por 6 dias e o brotamento total de novos vasos a partir de um vaso pré-existente foi determinado. Neste ensaio, o efeito do veículo de LNO₂ também foi avaliado. Ao analisarmos as culturas de anéis de aorta de rato constatamos que o tratamento com o veículo (etanol 0,1% v/v) não demonstrou efeito significante na formação de novos brotamentos provenientes do anel aórtico quando comparado ao grupo controle.

No entanto, ao avaliarmos os anéis aórticos tratados com concentrações variadas de LNO $_2$ (0,001-10 μ M) verificamos que o brotamento de vasos, determinado pelo comprimento total dos brotamentos, foi estimulado de maneira significativa com o tratamento com LNO $_2$ nas concentrações de 1 e 10 μ M (Figura 14) similarmente ao resultado encontrado no ensaio de migração de células endoteliais.

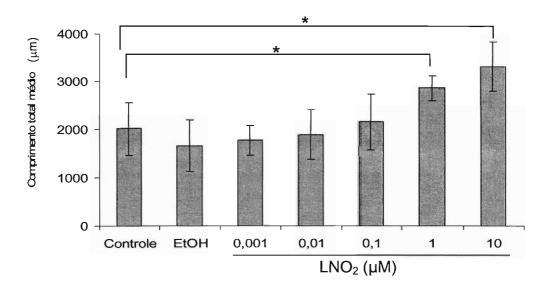


Figura 14. LNO₂ estimula angiogênese ex vivo. Os efeitos de concentrações diversas de LNO₂ (0,001-10 μM) na formação de novos vasos foram determinados em modelo de anéis de aorta de rato. Os anéis de aorta de rato foram embebidos em colágeno tipo 1 (extraído de cauda de rato) e incubados com LNO₂ (0,001-10 μM) por 6 dias conforme descrito anteriormente. Os dados estão expressos como comprimento total médio de túbulos por anel aórtico \pm D.P. (n=5).).* *P*<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Universidade de São Paulo

Para constatarmos se o efeito observado com o tratamento de LNO₂ poderia ser resultante de sua molécula precursora, repetimos o ensaio tratando os anéis aórticos também com LA nas concentrações de 1 e 10 μM. Ao analisarmos as culturas de anéis de aorta de rato constatamos que o tratamento com LA (1-10 μM) foi semelhante ao grupo controle demonstrando que o efeito observado era somente apresentado pelo tratamento com a molécula de ácido linoléico nitrado (Figura 15).

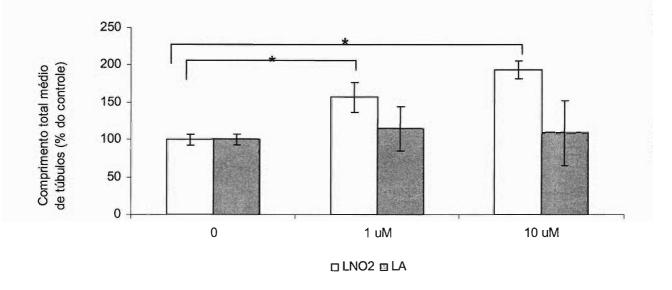


Figura 15. Os efeitos de LNO $_2$ sobre o processo angiogênico são independentes de sua molécula precursora. Os efeitos de LA e LNO $_2$ (1-10 μ M) foram determinados na formação de novos vasos em modelo de anéis de aorta de rato como descrito anteriormente. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao controle \pm D.P. (n=10). * P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Posteriormente, para avaliarmos se o efeito observado com o tratamento com LNO₂ 10 μM seria induzido por outro lípide nitrado, o ensaio de anel de aorta de rato foi realizado com OANO₂ 10 μM e sua molécula precursora OA na mesma concentração. Conforme esperado, o acido oléico nitrado na concentração de 10 μM aumentou de maneira significante o brotamento de novos vasos provenientes do anel aórtico (Figura 16).

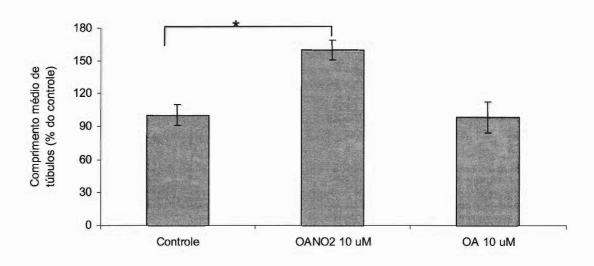


Figura 16. OANO₂ **estimula angiogênese ex vivo.** Os efeitos de OANO
₂ 10 μM e OA 10 μM na formação de novos vasos foram determinados em modelo de anéis de aorta de rato. Os anéis de aorta de rato foram embebidos em colágeno tipo 1 (extraído de cauda de rato) e incubados com os tratamentos por 6 dias conforme descrito anteriormente. Os dados estão expressos como Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao controle \pm D.P. (n=7). * P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Em seguida, para determinar a participação de *NO no efeito observado, o ensaio foi repetido com LNO₂ e OANO₂ em anéis aórticos pré-tratados com o seqüestrador de *NO c-PTIO (100 μM). Os resultados obtidos demonstraram que a presença do grupo nitro nas moléculas de LNO₂ e OANO₂ é fundamental para o brotamento de novos vasos uma vez que os efeitos demonstrados pelos tratamentos com LNO₂ 10 μM e OANO₂ 10 μM não são detectados quando os anéis de aorta de rato são pré-tratados com c-PTIO 100 μM (Figura 17).

Adicionalmente, para esclarecer a participação do *NO endógeno nos efeitos demonstrados pelos NO₂-FA neste ensaio, uma abordagem similar à empregada no ensaio de migração celular foi utilizada. Com este propósito, repetimos o ensaio e os anéis aórticos foram pré-tratados com L-NMMA (500 μM) antes de serem expostos aos tratamentos com os NO₂-FA. Interessantemente, como pode ser observado na Figura 18, o *NO produzido pelas células endoteliais do anel de aorta também exerce um papel importante no brotamento de novos vasos, pois o efeito demonstrado pelo tratamento com LNO₂ 10 μM também diminuiu pela inibição da óxido nítrico sintase.

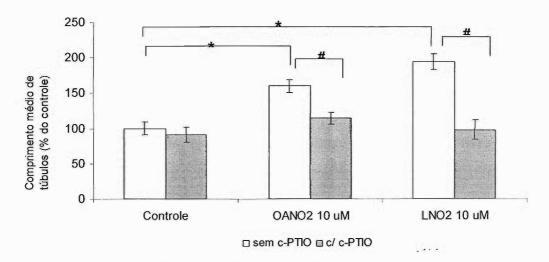


Figura 17. O pré-tratamento com c-PTIO (100 μM) inibe o brotamento de novos vasos induzido por LNO $_2$ 10 μM e OANO $_2$ 10 μM. Os efeitos de OANO $_2$ 10 μM e LNO $_2$ 10 μM na formação de novos vasos foram determinados em modelo de anéis de aorta de rato. Os anéis de aorta de rato foram embebidos em colágeno tipo 1 (extraído de cauda de rato) e pre-tratados com c-PTIO (100 μM) antes de serem incubados com os tratamentos por 6 dias conforme descrito anteriormente. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao controle \pm D.P. (n=7). * P<0,05 quando comparado ao grupo sem pré-tratamento.

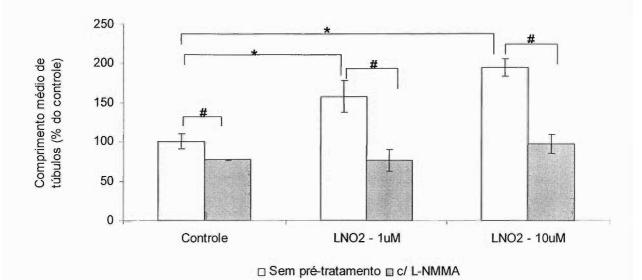


Figura 18. O pré-tratamento com L-NMMA (500 μ M) também inibe o brotamento de novos vasos induzido por LNO₂ 1 e 10 μ M. Os efeitos de LNO₂ 1 e 10 μ M na formação de novos vasos foram determinados em modelo de anéis de aorta de rato. Os anéis de aorta de rato foram embebidos em colágeno tipo 1 (extraído de cauda de rato) e pre-tratados com L-NMA (500 μ M) antes de serem incubados com os tratamentos por 6 dias conforme descrito anteriormente. Os dados estão expressos como porcentagem média relativa ao controle \pm D.P. (n=7).* P<0,05 quando comparado ao grupo sem pré-tratamento.

As fotos representativas dos anéis aórticos dos grupos controle, veículo, LNO $_2$ 10 μ M, OANO $_2$ 10 μ M são apresentadas na Figura 19 bem como as fotos representativas dos anéis aórticos tratados com LNO $_2$ 10 μ M e OANO $_2$ 10 μ M contendo o pré-tratamento com carboxi-PTIO (100 μ M).

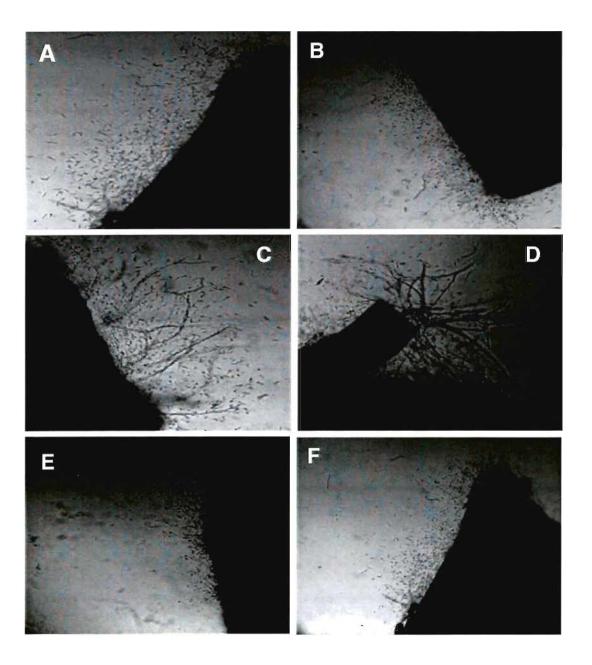


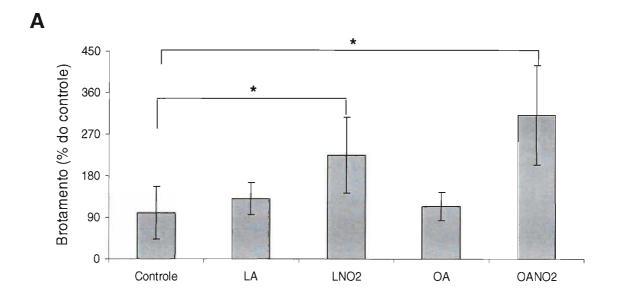
Figura 19. Fotos representativas de anéis aórticos. Os anéis são representativos do grupo controle (A); tratados com veículo (etanol 0,1% v/v) (B); LNO $_2$ 10 μ M (C); OANO $_2$ 10 μ M (D); LNO $_2$ 10 μ M+c-PTIO (E) e OANO $_2$ 10 μ M + c-PTIO (F).

4.6 Lipides nitrados estimulam o processo angiogênico em modelo animal

Após observarmos que os NO₂-FA demonstravam efeitos pro-angiogenicos em células endoteliais e estimulavam o brotamento de novos vasos em um modelo *ex vivo*, os efeitos dos NO₂-FA foram avaliados em um modelo *in vivo*. Por conseguinte, o modelo de membrana corioalantoica (CAM) de embrião de galinha foi utilizado. Neste ensaio, a CAM foi incubada com papéis de filtro embebidos com a soluções dos NO₂-FA ou seus precursores. Ao término do ensaio, as CAM foram retiradas juntamente com o papel de filtro e imagens das mesmas foram captadas.

Após análise das imagens obtidas das CAMs tratadas com veículo (etanol < 0,1%), LNO₂ (10 μM), LA (10 μM), OANO₂ (10 μM) ou OA (10 μM) foi constatado que o tratamento com as moléculas precursoras, LA e OA, não demonstrou qualquer efeito significante no processo angiogênico neste modelo *in vivo*. No entanto, os tratamentos com LNO₂ e OANO₂ estimularam de modo significante a formação de neovasos provenientes de vasos préexistentes (Figura 20). Na Figura 20B as fotos representativas dos grupos experimentais são apresentadas.

Todos os resultados obtidos em relação à investigação dos efeitos biológicos dos NO₂-FA corroboram a hipótese de que estes compostos podem modular o processo de angiogênese. Desta forma, comprova-se que os NO₂-FA são capazes de atuar como mediadores pró-angiogênicos.



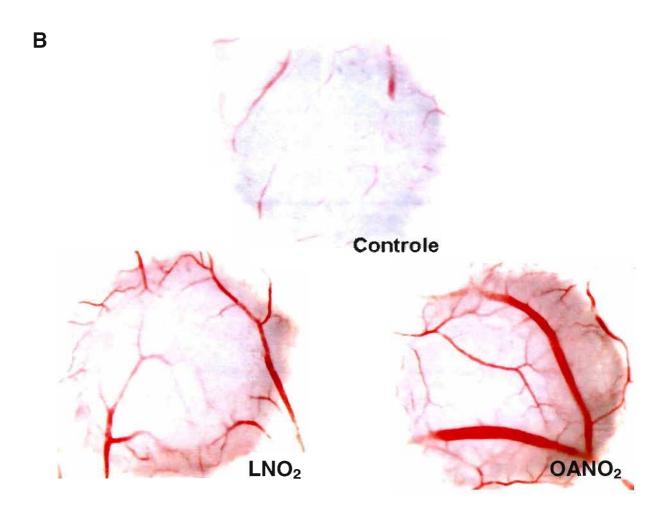


Figura 20. Lipides nitrados estimulam a neovascularização em modelo in vivo. (A) Os efeitos do tratamento de CAM de embriões de galinha com LA 10 μ M, LNO $_2$ 10 μ M, OA 10 μ M e OANO $_2$ 10 μ M foram determinados conforme descrito anteriormente. Os dados estão expressos como brotamento total (% do controle) \pm D.P. (n=18). * P<0,05 quando comparado ao grupo controle. (B) Fotos representativas dos grupos experimentais: controle, LNO $_2$ 10 μ M e OANO $_2$ 10 μ M.

4.7 Mecanismos de ação dos lípides nitrados

Até este ponto do trabalho, foi possível demonstrar que os NO₂-FA podem induzir significativamente a formação de novos vasos. Um achado importante dessa etapa é que a liberação de *NO a partir desses compostos constitui um mecanismo potencial pelo qual os lípides nitratos exercem a sua influência sobre o processo de angiogênese.

O próximo passo foi entender as vias de sinalização pelas quais os NO₂-FA estimulavam a angiogênese. Sendo assim, a série de experimentos a seguir teve como objetivo examinar a atuação dos NO₂-FA sobre mediadores importantes na sinalização celular do processo angiogênico.

4.7.1 Lípides nitrados estimulam a expressão de genes próangiogênicos

Visando avaliar como os NO₂-FA estimulavam o processo de angiogênese, o primeiro objetivo foi analisar os efeitos destes compostos sobre a expressão gênica de moduladores do processo angiogênico previamente relatados. Devido a uma variabilidade substancial de mediadores descritos na literatura, foram escolhidos os principais mediadores angiogênicos, cuja expressão aumentada foi também relatada em lesões ateroscleróticas humanas (Hughes *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Barret *et al.*, 1998; Lappalainen *et al.*, 2004;). Desse modo, o efeito dos NO₂-FA na expressão do RNA mensageiro de genes pró-angiogênicos foi avaliado em células endoteliais da linhagem EA.hy926 bem como da linhagem HUVEC. A expressão do RNAm foi detectada pela reação de qRT-PCR utilizando primers específicos para cada gene (apresentados na seção de materiais e métodos).

Inicialmente, o padrão de expressão de mediadores angiogênicos foi avaliado em células endoteliais EA.hy926. O tratamento com os NO₂-FA por um período de incubação de 4h induziu um aumento significativo no RNAm exclusivamente de VEGF (Figura 21). Em seguida, esse período foi aumentado para 16h, no qual se observou que a expressão de ambos os genes, VEGF e VEGFR1, foram significativamente aumentadas com LNO₂ 10μM, ao passo que OANO₂ apenas favoreceu novamente o aumento da expressão de VEGF (Figura 22). Em contraste ao VEGF, os níveis de expressão de VEGFR2, MMP2, MMP9, FGF e PDFG-BB permaneceram inalterados com o tratamento com os NO₂-FA nos dois tempos de incubação avaliados. Além disso, o tratamento com LA 10 μM não apresentou qualquer efeito significativo sob as condições experimentais utilizadas.

O efeito dos NO₂-FA sobre a expressão de genes pró-angiogênicos foi avaliado também em células endoteliais HUVEC. Diferente dos achados com a linhagem EA.hy926, nenhum efeito significativo sobre a expressão de genes pró-angiogênicos foi detectado em células HUVEC tratadas com ambos NO₂-FA por 16h (dados não mostrados). Desse modo, tempos menores de incubação foram explorados. Ao utilizar essa abordagem, igualmente um aumento único nos níveis de RNAm de VEGF foi observado. Conforme pode ser visto na figura 23A, o tratamento por 4h com OANO₂ 10 μM provocou um aumento de 5,6 vezes nos níveis de RNAm de VEGF quando comparado ao controle. Porém, o tratamento com LNO₂ 10 μM demonstrou um efeito de magnitude semelhante (6,3 vezes) somente em um período de incubação de 6h. Similar aos efeitos descritos em EA.hy926, os ácidos graxos precursores não afetaram de modo significativo a expressão gênica de qualquer um dos mediadores avaliados em HUVEC independente do tempo de incubação testado (dados não mostrados).

Em posterior análise, para evidenciar a participação da liberação de 'NO no efeito dos NO₂-FA sobre a expressão de VEGF, células HUVEC pré-tratadas ou não com c-PTIO por 1h foram incubadas com OANO₂ 10 μM e LNO₂ 10 μM por 4 e 6h, respectivamente.

Como mostra a figura 23B, o pré-tratamento com c-PTIO preveniu de modo significativo o aumento dos níveis de RNAm de VEGF demonstrado pelos NO₂-FA, sugerindo que a liberação de *NO da molécula dos NO₂-FA pode ser uma etapa fundamental para a indução de VEGF.

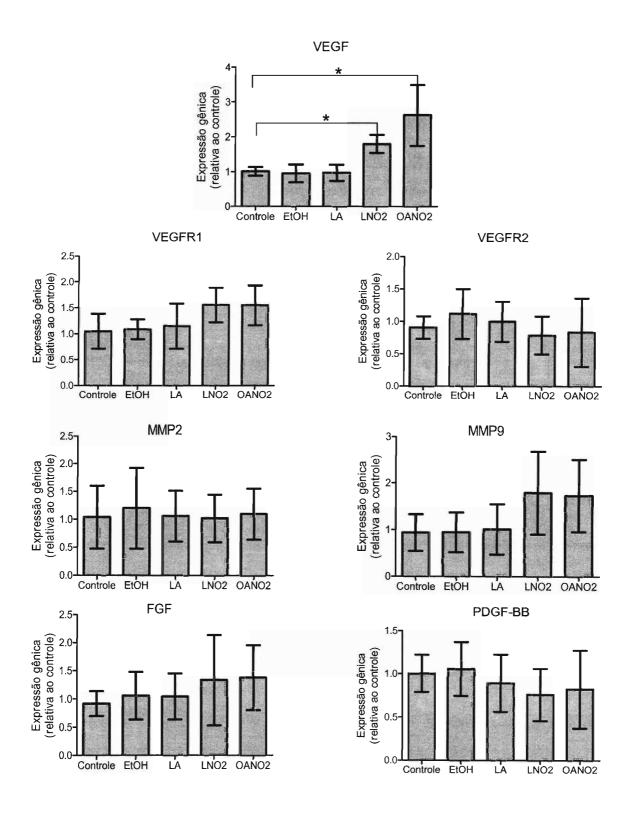


Figura 21. NO₂-FA induzem a expressão de VEGF. Células da linhagem EA.hy926 foram tratadas com EtOH 0,1% ou LA, LNO₂, OANO₂ na concentração de 10 μ M por 4h. RNAm de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, MMP2, MMP9, FGF e PDGF-BB e da proteína ribossomal 16S foram determinados por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle.

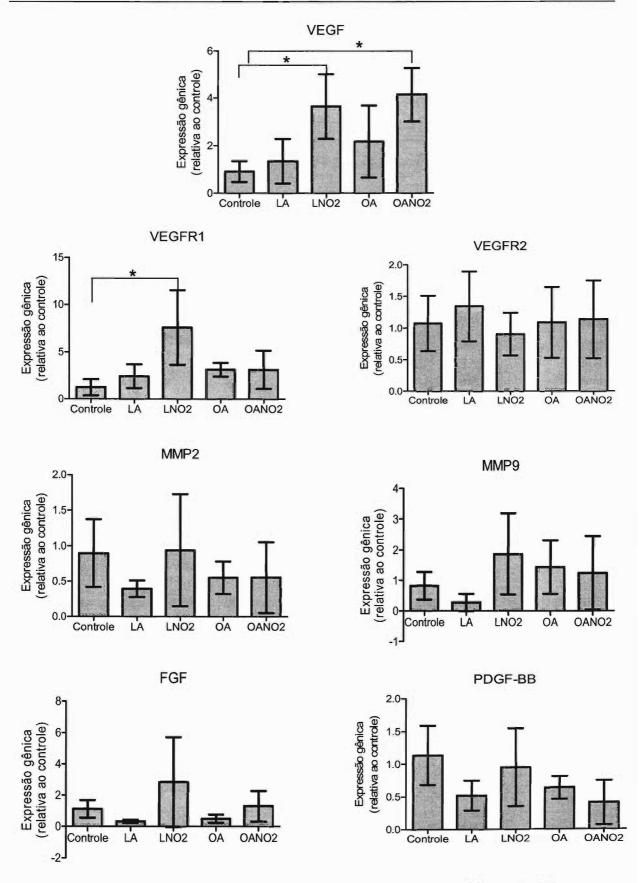
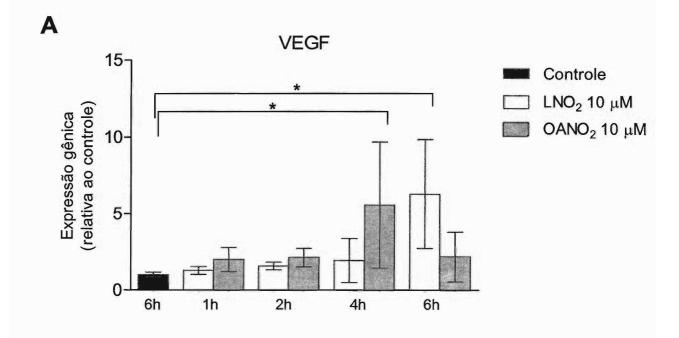


Figura 22. NO_2 -FA induzem a expressão de VEGF e VEGFR1. Células da linhagem EA.hy926 foram tratadas com LA, LNO₂, OANO₂ ou OA na concentração de 10 μ M por 16h. RNAm de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, MMP2, MMP9, FGF e PDGF-BB e da proteína ribossomal 16S foram determinados por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle.



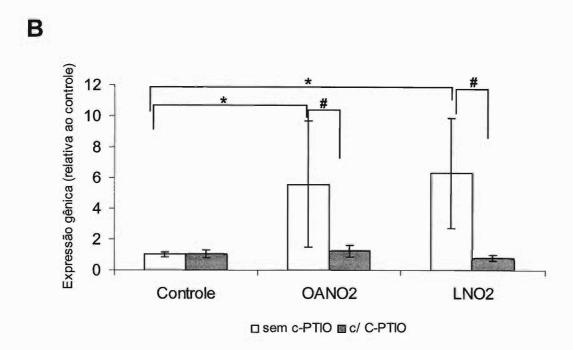


Figura 23. NO₂-FA induzem a expressão de VEGF em células endoteliais HUVEC via mecanismo dependente de NO. Células da linhagem HUVEC foram tratadas com LNO₂ e OANO₂ 10 μM por 1 a 6h (A) Células HUVEC pré-tratadas ou não com c-PTIO 100 μM foram incubadas com OANO₂ e LNO₂ por 4 e 6h, respectivamente (B). RNAm de VEGF e da proteína ribossomal 16S foram determinados por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle. # P<0,05 comparado ao grupo sem pré-tratamento com c-PTIO.

4.7.2 LNO₂ estimula a secreção de proteínas pró-angiogênicas em cultura de células endoteliais

Com o objetivo de elucidar os efeitos pró-angiogênicos dos NO₂-FA, foram avaliados os efeitos sobre a secreção de proteínas pró- e anti-angiogênicas secretadas no meio de cultura. Para isso, as células endoteliais HUVEC foram estimuladas com veículo (etanol 0,1%), LNO₂ 10 μM ou LA 10 μM por 24h. O meio condicionado foi coletado e analisado com o *kit RayBio*[®] *Human Angiogenesis Antibody Array C Series 1000*, conforme instruções do fabricante.

Conforme ilustrado na Figura 24, o tratamento com LNO₂ 10 μM induziu a expressão de proteínas pró-angiogênicas, especialmente VEGF e PDGF-BB quando comparado ao perfil de proteínas secretadas em células controle. Em contraste ao efeito observado com LNO₂ 10 μM, o tratamento com LA 10 μM inibiu a expressão de proteínas pró-angiogênicas, sendo o efeito mais evidente sobre proteínas pró-inflamatórias, que também atuam sobre o processo angiogênico, como interleucina-6 e 8.

Apenas um leve efeito inibitório foi detectado pelo tratamento com LNO $_2$ 10 μ M sobre a secreção de angiopoietina-2 quando observado o *array* de proteínas anti-angiogênicas (Figura 25). Além disso, nenhum efeito foi observado pelo tratamento com LA 10 μ M sobre a expressão de proteínas anti-angiogênicas (Figura 25). Adicionalmente, o tratamento de células endoteliais HUVEC com LNO $_2$ 10 μ M e LA 10 μ M apresentou efeitos distintos, demonstrando que a adição do grupo nitro na molécula de LA modifica sua capacidade como molécula sinalizadora.

Α

	POS	NEG	NEG	<u>Angiogenina</u>	<u>EGF</u>	ENA-78	<u>bFGF</u>
POS	POS	NEG	NEG	<u>Angiogenina</u>	<u>EGF</u>	ENA-78	<u>bFGF</u>
<u>GRO</u>	<u>IFN - γ</u>	<u>IGF-I</u>	<u>IL-6</u>	<u>IL-8</u>	<u>Leptina</u>	MCP-1	PDGF-BB
<u>GRO</u>	IFN - γ	<u>IGF-I</u>	<u>IL-6</u>	<u>IL-8</u>	<u>Leptina</u>	MCP-1	PDGF-BB
PIGF	RANTES	TGF-β1	TIMP-1	TIMP-2	<u>Thrombopoietina</u>	<u>VEGF</u>	VEGF-D
PIGF	RANTES	TGF-β1	TIMP-1	TIMP-2	<u>Thrombopoietina</u>	VEGF	VEGF-D
Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	NEG	POS
Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	NEG	POS

B

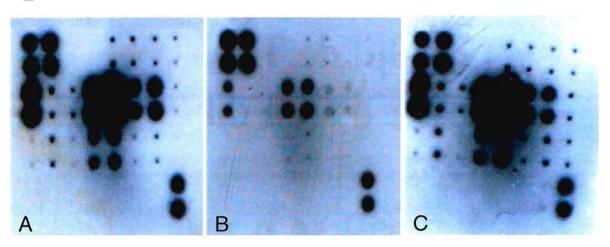


Figura 24. LNO₂ 10 μM induz a expressão de proteínas pró-angiogênicas. (A) Mapa das localizações dos anticorpos na membrana. Em negrito são representadas as proteínas induzidas pelo tratamento com LNO₂ 10 μM quando comparado ao grupo de células tratadas com veículo. A porção do texto sublinhada representa as proteínas inibidas por LA 10μΜ. (B) Fotos representativas das membranas expostas aos meios condicionados de células endoteliais tratadas com etanol 0,1% (A), LA 10 μM (B) e LNO₂ 10 μM (C), conforme método descrito acima.

Α

POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietina-1	Angiopoietina-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietina-1	Angiopoietina-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-4
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF-α
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF-α
uPAR	VEGFR2	VEGFR3	Branco	Branco	Branco	Branco	POS
uPAR	VEGFR2	VEGFR3	Branco	Branco	Branco	Branco	POS

В

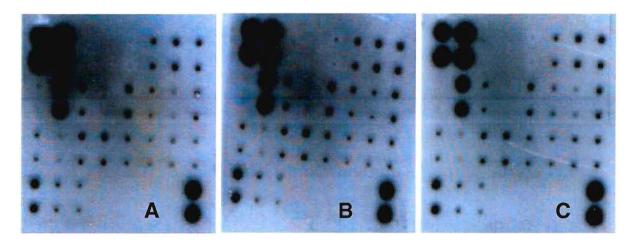


Figura 25. LNO $_2$ 10 μ M inibe a expressão de proteínas anti-angiogênicas. (A) Mapa das localizações dos anticorpos na membrana. Em negrito são representadas as proteínas inibidas pelo tratamento com LNO $_2$ 10 μ M quando comparado ao grupo de células tratadas com veículo. (B) Fotos representativas das membranas expostas aos meios condicionados de células endoteliais tratadas com etanol 0,1% (A), LA 10 μ M (B) e LNO $_2$ 10 μ M (C), conforme método descrito acima

Em uma segunda abordagem, as células HUVEC foram estimuladas com os NO₂-FA ou seus ácidos graxos precursores por 24h. O meio de cultura foi coletado para se avaliar a concentração de VEGF secretado através da técnica de ELISA. Ao contrario do esperado, nenhum efeito significativo foi detectado na secreção de VEGF nos meios de culturas celulares tratadas com os NO₂-FA ou suas moléculas precursoras (Figura 26).

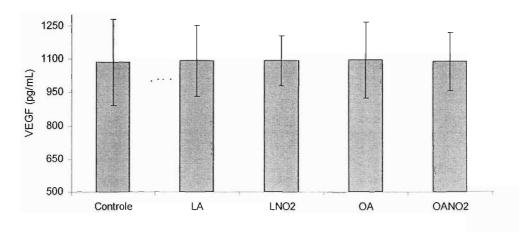


Figura 26. Efeitos dos NO_2 -FA sobre a secreção de VEGF em meio de cultura. Células HUVEC foram estimuladas com LA, LNO $_2$, OA ou OANO $_2$ 10 μ M por 24h e o meio foi coletado para dosagem de VEGF por ELISA através de kit comercial seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.7.3 LNO₂ aumenta a atividade de MMP-9

Os efeitos dos NO₂-FA também foram avaliados sobre a atividade de MMPs. Embora o tratamento com LNO₂ não tenha influenciado a atividade da MMP2 (Figura 27A), um aumento significativo na atividade de MMP9 foi observado no meio de cultura das células tratadas com LNO₂ 10 μM (Figura 27B). Contudo, nenhum efeito significativo foi detectado no meio de cultura tratado com sua molécula precursora, LA, sobre a atividade de ambas MMPs. No entanto, a inibição do efeito induzido pelo tratamento de LNO₂ foi observada com o pré-tratamento com o seqüestrador de 'NO, c-PTIO, bem como uma diminuição da atividade de MMP-9 do grupo controle, sugerindo que a atividade desta MMP seria dependente de 'NO (Figura 28).

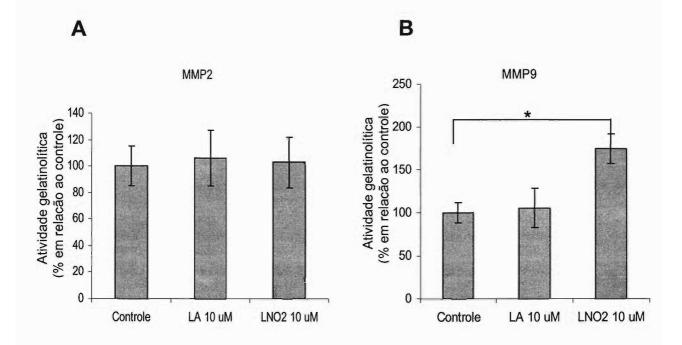


Figura 27. LNO₂ 10 μ M induz um aumento na atividade de MMP9. Células HUVEC foram tratadas com etanol 0,1%, LA 10 μ M ou LNO₂ 10 μ M por 24h e a atividade de MMP2 (A) e MMP9 (B) foram avaliadas por zimografia. Os dados sumarizam média \pm desvio padrão * P<0,05 comparado ao grupo controle.

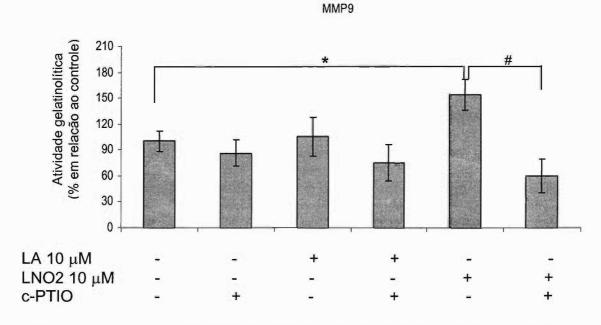


Figura 28. LNO₂ 10 μM induz um aumento na atividade de MMP9 via mecanismo dependente de NO. Células HUVEC pré-tratadas ou não com c-PTIO 100 μM por 1h foram incubadas com etanol 0,1%, LA 10 μM ou LNO₂ 10 μM por 24h e a atividade de MMP9 foi avaliada por zimografia. Os dados são expressos média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle. # P<0,05 comparado ao grupo sem pré-tratamento com c-PTIO.

4.7.4 Lípides nitrados induzem o acumulo da proteína HIF-1a

HIF-1 α é apontado como o principal fator de transcrição envolvido na indução da expressão de VEGF e como fator predominante na iniciação da angiogênese. Objetivando testar se os NO₂-FA modulam HIF-1 α , os efeitos destes compostos sobre a expressão e estabilização da proteína foram examinados em células endoteliais.

Inicialmente a linhagem EA.hy926 foi utilizada. As células foram estimuladas com os lípides nitrados por períodos de tempo entre 30 min e 4h e o acúmulo da proteína HIF-1α foi analisado por *western blot*. Estes tempos foram eleitos com base em outros trabalhos descrevendo que doadores de óxido nítrico sintéticos demonstravam efeito nesta faixa de tempo (Sandau *et al.*, 2001; Metzen *et al*, 2003). Neste experimento o doador de *NO, GSNO, e a hipóxia foram utilizados como controles positivos. O controle da molécula precursora foi realizado pela incubação das células com o ácido linoléico na concentração de 10 μM.

Como ilustrado na Figura 29A, os tratamentos com os lípides nitrados, LNO $_2$ e OANO $_2$ (10 μ M), não foram capazes de induzir qualquer alteração nos níveis de HIF-1 α , indicando que os lípides nitrados não induziam o acúmulo de HIF-1 α nos períodos analisados. Do mesmo modo, o ácido graxo precursor não demonstrou efeitos significativos sobre a expressão dessa proteína.

No intuito, de ampliar essa investigação, uma cinética de períodos de incubação diferentes foi empregada. Como é possível observar na figura 29B, os tratamentos com os lípides nitrados induzem um aumento no acúmulo da proteína HIF1α. No entanto, enquanto o tratamento com OANO₂ favorece um acúmulo da proteína HIF1α com 8h de incubação, o tratamento com LNO₂ 10 μM demonstrou apenas um efeito tardio, sendo detectado um efeito significativo no acúmulo de proteína somente no tempo de 24h.

Interessantemente, além do acúmulo de proteína, os tratamentos com NO₂-FA aumentaram significativamente também o RNAm de HIF-1α. Níveis de RNAm atingiram um aumento de 4 e 6,5 vezes com a incubação por 16h com OANO₂ 10 μM e LNO₂ 10 μM, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 29C). Entretanto, os ácidos graxos precursores, LA e OA não demonstraram qualquer efeito significativo sobre o RNAm de HIF-1α.

A próxima etapa foi investigar os efeitos dos lípides nitrados sobre a estabilização da proteína HIF-1α também em células endoteliais HUVEC. Nestas células, ambos NO₂-FA induziram a estabilização da proteína em tempos distintos quando comparados aos efeitos demonstrados na linhagem EA.hy926. Como mostra a figura 30A, o LNO₂ induziu ao aumento significante de HIF-1α a partir de 1h de incubação, apresentando um pico de efeito máximo em 8h, permanecendo a proteína ligeiramente aumentada nos períodos de 16 e 24h.

Similarmente ao efeito observado em EA.hy926, OANO $_2$ demonstrou um efeito mais rápido quando comparado ao LNO $_2$. Contudo, o pico de ativação de HIF-1 α foi observado em 4h, seguido de diminuição gradativa na indução de HIF-1 α em 8h e ausência de efeito nos tempos de incubação de 16 e 24h (Figura 30B).

O aumento dos níveis de RNAm foi detectado igualmente em células HUVEC. Embora a magnitude dos efeitos tenha sido semelhante à encontrada com a linhagem EA.hy926, novamente os efeitos diferiram no tempo de ativação, sendo o acumulo de RNAm induzido por OANO₂ e LNO₂ observado nos tempos de 4 e 6h, respectivamente (Figura 30C).

Uma vez que as moléculas precursoras dos NO₂-FA apresentaram apenas uma pequena indução na estabilização de HIF-1α (dados não mostrados), seria a liberação do *NO dos NO₂-FA uma maneira de explicar os efeitos aqui descritos? Para abordar essa

questão, as células endoteliais HUVEC pré-tratadas ou não com o seqüestrador de *NO, c-PTIO 100 μ M, foram estimuladas com LNO $_2$ 10 μ M ou OANO $_2$ 10 μ M por 8h e 4h, respectivamente. Estes períodos foram estrategicamente escolhidos devido ao fato dos NO $_2$ -FA apresentarem o seu pico máximo de efeito no acumulo de proteínas. A partir da figura 30D, pode-se depreender que a presença do seqüestrador de *NO não só diminuiu parcialmente a expressão basal de HIF-1 α mas também aboliu significativamente os efeitos dos NO $_2$ -FA. Do mesmo modo, a presença de c-PTIO inibiu significativamente os efeitos dos NO $_2$ -FA sobre a expressão gênica de HIF-1 α em células HUVEC tratadas com OANO $_2$ e LNO $_2$ por 4 e 6h, respectivamente (Figura 30E).

Conjuntamente, esses achados corroboram a hipótese de que os NO_2 -FA aumentam a estabilização da proteína HIF-1 α , e que os efeitos observados são dependentes da liberação de *NO.

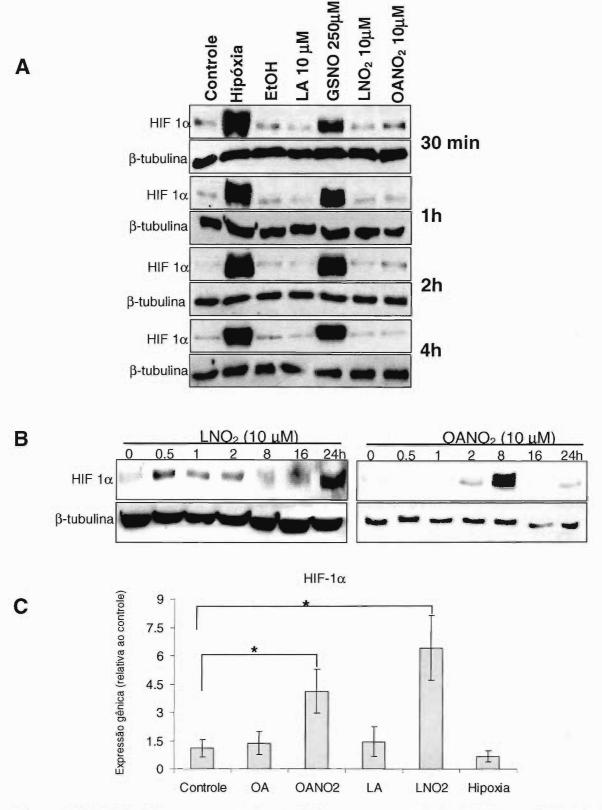


Figura 29. NO₂-FA induzem o acúmulo de RNAm e da proteína de HIF-1 α em EA.hy926. (A) EA.hy926 foram incubadas em hipóxia (1% de O₂) ou com EtOH (0,1%), LA 10 μM, GSNO 250 μM, LNO₂ 10 μM e OANO₂ 10 μM em condições normais de O₂ por 0.5 a 4h. (B) EA.hy926 foram tratadas com LNO₂ 10 μM e OANO₂ 10 μM por 0,5 a 24h. Expressão relativa de HIF-1 α e β -tubulina foi verificada por *western blot*. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. (C) EA.hy926 foram tratadas com LA 10 μM, OA 10 μM, LNO₂ 10 μM e OANO₂ 10 μM por 16h. RNAm de HIF-1 α e da proteína ribossomal 16S foi determinado por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle.

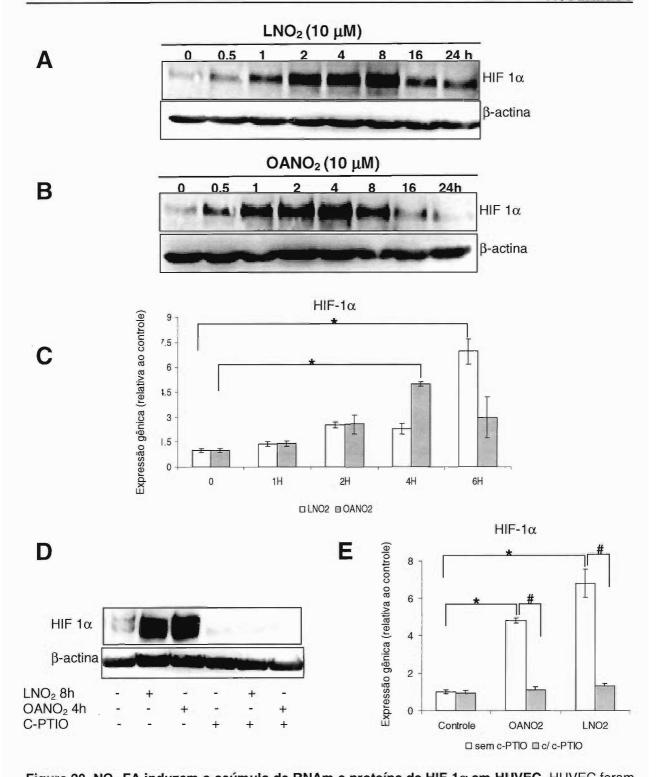


Figura 30. NO₂-FA induzem o acúmulo de RNAm e proteína de HIF-1α em HUVEC. HUVEC foram tratadas com LNO₂ 10 μM (A) ou OANO₂ 10 μM (B) por 0,5 a 24h. Expressão relativa de HIF-1α e β -actina foi verificada por *western blot*. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. (C) HUVEC foram tratadas com NO₂-FA por 1 a 6h. RNAm de HIF-1α e da proteína ribossomal 16S foi determinado por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle. (D) HUVEC pré-tratadas ou não com c-PTIO foram incubadas com OANO₂ e LNO₂ por 4 e 8h, respectivamente. Expressão relativa de HIF-1α e β -actina foi verificada por *western blot*. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. (E) HUVEC pré-tratadas ou não com c-PTIO foram incubadas com OANO₂ e LNO₂ por 4 e 6h, respectivamente. RNAm de HIF-1α e da proteína ribossomal 16S foram determinados por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle. # P<0,05 comparado ao grupo sem pré-tratamento com c-PTIO.

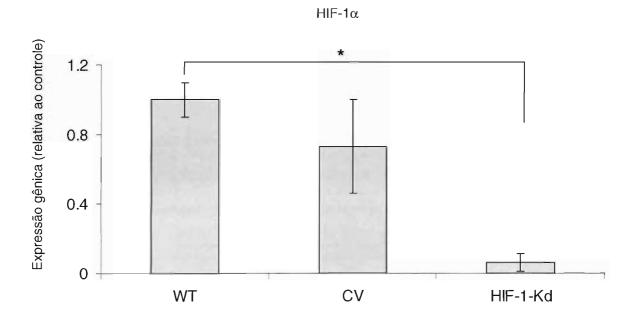
4.7.5 Os efeitos pró-angiogênicos dos NO $_2$ -FA são mediados por HIF-1 α

Os experimentos descritos anteriormente demonstraram que os NO_2 -FA podem induzir a expressão do principal fator de transcrição da angiogênese, HIF-1 α . Uma hipótese que surge a partir desses dados é: seriam os efeitos pró-angiogênicos dos NO_2 -FA mediados por HIF-1 α ? Para avaliar essa possibilidade, foram utilizadas células endoteliais *knockdown* para o gene HIF-1 α .

Primeiramente, as células endoteliais com silenciamento estável para o gene HIF-1α foram estabelecidas. Para tanto, as células endoteliais EA.hy926 foram infectadas com plasmidios com partículas de lentivírus inativas contendo ou não a seqüência do gene de interesse. Posteriormente, os clones foram selecionados com meio de cultura suplementado com puromicina 5 μg/mL e a eficiência do silenciamento do gene de interesse foi confirmada por *real-time* PCR e *western blot*.

Conforme ilustrado na figura 31A, o protocolo utilizado provocou um silenciamento de 96% da expressão gênica de HIF-1α. Por sua vez, a infecção com plasmidios lentivirais sem a seqüência do gene de interesse não demonstrou alteração significativa no RNA mensageiro de HIF-1α. Além disso, a eficiência do silenciamento do gene HIF-1α foi adicionalmente confirmada por *western blot*. Para tanto, as células foram incubadas em condições de hipóxia (1% O₂) ou normóxia por 4h e a expressão de HIF-1α em resposta a estas condições foi avaliada. Como pode ser visto na Figura 31B, as células *knockdown* para o gene HIF-1α demonstraram uma resposta diminuída a hipóxia, ao passo que células *wild-type* bem como células infectadas com plasmidios lentivirais sem a seqüência de interesse apresentaram respostas similares.







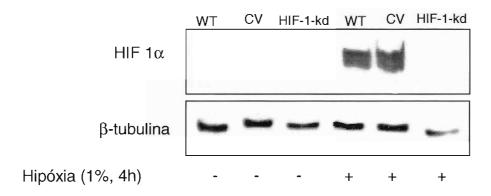


Figura 31. Caracterização de celulas *knockdown* para o gene HIF-1α. (A) Expressão gênica relativa de HIF-1α em células *wild-type* (WT), células infectadas com plasmidios sem a seqüência de interesse (CV) e células infectadas com plasmidios contendo a seqüência de interesse (HIF-1-kd). O RNAm de HIF-1α e da proteína ribossomal 16S foi determinado por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo WT. (B) Células WT, CV e HIF-1kd foram incubadas sob normóxia ou hipóxia por 4h. Expressão relativa de HIF-1α e β-tubulina foi verificada por *western blot*. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes.

Posteriormente, a linhagem estabelecida foi utilizada para elucidar o papel de HIF- 1α nos efeitos pró-angiogênicos demonstrados pelos NO_2 -FA no presente estudo. Com este propósito, monocamadas de células endoteliais *wild-type* e *knockdown* para o gene HIF- 1α contendo uma fenda realizada com o auxilio de uma microponteira, foram incubadas com diferentes tratamentos por 24h. As monocamadas foram fotografadas ao início e ao término da incubação e o efeito sobre a migração celular foi avaliado.

Como representado na figura 32, o silenciamento de HIF-1 α não alterou a migração basal de células endoteliais. Adicionalmente, nenhum efeito foi detectado ao observarmos a migração de células *knockdown* tratadas com LNO₂ 10 μ M e OANO₂ 10 μ M. Desse modo, esses dados evidenciam que os efeitos demonstrados pelos NO₂-FA anteriormente seriam mediados por HIF-1 α .

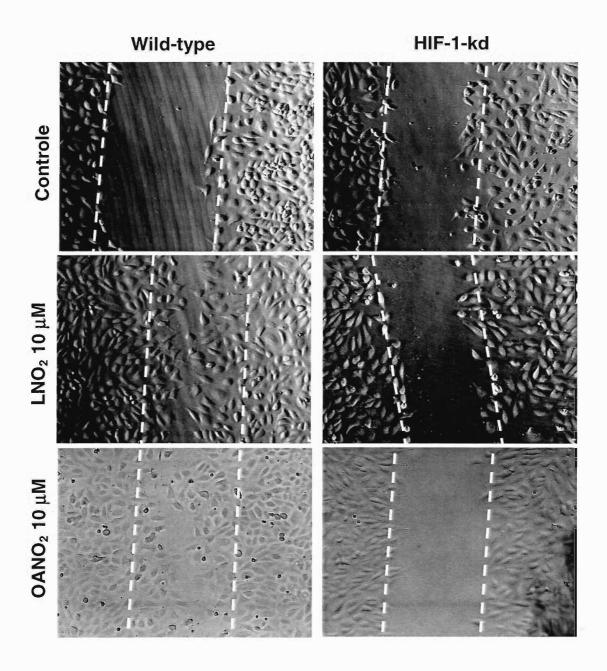


Figura 32. A migração celular induzida por NO_2 -FA é mediada por HIF-1 α . Monocamadas de células WT e HIF-1-kd lesionadas com uma micropipeta foram incubadas na presença ou ausência de LNO $_2$ 10 μ M e OANO $_2$ 10 uM. Fotos representativas do efeito dos NO_2 -FA após 24h de incubação sobre a migração de células endoteliais EA.hy926 e células *knockdown* para o gene HIF-1 α .

Para investigar se os efeitos dos NO₂-FA sobre a expressão de VEGF também dependem de HIF-1α, as células *knockdown* para HIF-1α foram novamente empregadas. Essas células foram incubadas na presença ou ausência de LNO₂ ou OANO₂ 10 μM e os efeitos sobre a expressão de VEGF foram avaliados por qRT-PCR. Devido ao fato das células *knockdown* serem provenientes da linhagem EA.hy926, as células foram estimuladas com os tratamentos por 16h, tempo de incubação em que os tratamentos com NO₂-FA demonstraram maior efeito sobre a expressão de VEGF(como mostrado anteriormente).

O silenciamento de HIF-1 α não interferiu na expressão basal de VEGF (Figura 33). Interessantemente, porém, o efeito indutivo do tratamento com NO₂-FA sobre a expressão de VEGF foi completamente abolido com o silenciamento de HIF-1 α (Figura 33).

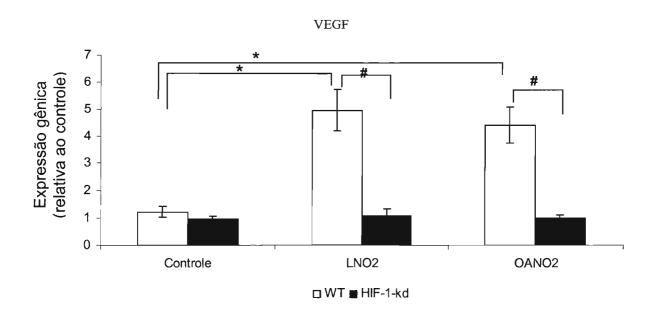


Figura 33. O efeito dos NO₂-FA sobre a expressão de VEGF é mediado por HIF-1 α . Células EA.hy926 e células HIF-1-kd foram tratadas com LNO₂ ou OANO₂ 10 μM por 16h. RNAm de VEGF e da proteína ribossomal 16S foi determinado por qRT-PCR. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * P<0,05 comparado ao grupo controle da linhagem *wild-type*. # P<0,05 comparado a célula *knockdown* para HIF-1 α com o mesmo tratamento.

Em conjunto, estes resultados fortalecem a hipótese que os NO_2 -FA aumentam a expressão de VEGF, resultante da ativação de HIF-1 α , atuando desse modo como moduladores do processo de angiogênese.

5.0 Discussão

O principal achado deste trabalho é a demonstração que os NO₂-FA, LNO₂ e OANO₂ podem estimular a expressão do principal fator pró-angiogênico, VEGF via ativação do fator de transcrição HIF-1α. Baseado nos experimentos realizados, essa via de ativação NO₂-FA \rightarrow VEGF \rightarrow HIF pode induzir significativamente a migração de células endoteliais, o brotamento *ex vivo* e a formação de novos vasos sanguíneos *in vivo*. É importante mencionar que as concentrações utilizadas nos experimentos descritos acima são comparáveis às concentrações plasmáticas de nitrolípides totais descritas previamente em indivíduos sadios (Lima *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2004) e hipercolesterolêmicos (Lima *et al.*, 2003). Portanto, os NO₂-FA poderiam representar novos mediadores angiogênicos, especialmente em condições de inflamação e após o processo de isquemia-reperfusão, onde a formação aumentada de NO₂-FA foi recentemente descrita (Ferreira *et al.*, 2009; Nadtochiy *et al.*, 2009).

A angiogênese constitui o processo de formação e remodelamento da maioria dos vasos sanguíneos (Risau, 1997). Além de seu papel estabelecido durante a embriogênese (Coultas *et al.*, 1995), a angiogênese é atualmente reconhecida como um processo positivamente associado à patogênese de uma grande diversidade de condições clínicas, tais como doenças malignas, isquêmicas, infecciosas, imunes e principalmente inflamatórias (Carmeliet, 2005).

O processo de angiogênese demanda uma série de eventos celulares altamente coordenados, dentre eles a migração, a proliferação de células endoteliais e o brotamento de neovasos, os quais podem ser modulados por uma grande variedade de mediadores próe anti-angiogênicos (Adams e Alitalo, 2007). De fato, a literatura apresenta considerável documentação acerca dos efeitos das mais diversas moléculas pro-angiogênicas, tais como o VEGF, as quais estimulam ou inibem cascatas de sinalização, levando em última análise

ao processo que se caracteriza a angiogênese (Olsson et al., 2006). Desse modo, o reconhecimento de novos mediadores angiogênicos é de extrema importância no entendimento geral do processo de angiogênese bem como na busca de possíveis intervenções terapêuticas.

Os resultados deste trabalho demonstram que os NO₂-FA não alteram de modo significativo a proliferação e viabilidade de células endoteliais. Interessantemente, um estudo prévio aponta que o LNO₂ atua sobre a proliferação de células de músculo liso vascular em concentrações similares às utilizadas neste estudo (Villacorta *et al.*, 2007). Os autores sugerem que o LNO₂ poderia inibir a proliferação de células de músculo liso vasculares via sinalização do fator de transcrição Nrf2, *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*. A diferença nos resultados obtidos em nosso estudo quando comparado às investigações realizadas por Villacorta e colaboradores (2007) poderia ser explicada pelos diferentes tipos celulares utilizados. Realmente, diversos compostos apresentam efeitos célula—específicos. Por exemplo, enquanto o tratamento com fosfolípides oxidados inibe o crescimento e induz a apoptose de células vasculares (Fruhwirth *et al.*, 2006), concentrações similares falham em demonstrar o mesmo efeito em células endoteliais (Bochkov *et al.*, 2006).

Em contraste à ausência de efeitos sobre a proliferação de células endoteliais, nossos achados ilustram que os NO₂-FA induzem a migração celular. Em particular, devido à investigação sobre os efeitos do LNO₂ ter sido mais extensa, a mesma forneceu evidências de que a migração de células endoteliais induzida com os NO₂-FA seria doseresponsiva, pois concentrações menores que 1 μM não demonstraram qualquer efeito significativo.

Desse modo, apesar de não alterar a proliferação celular, os NO₂-FA podem ainda ser apontados como mediadores pró-angiogênicos. Nossos resultados estão de acordo com estudos de investigação de novas moléculas mediadoras do processo de angiogênese que

demonstram que certas moléculas pró-angiogênicas, tais como PAF-1 (Axelrad *et al.* 2004) ou PKC8 (Harrington *et al.* 1997) não demonstram efeito sobre a proliferação celular. Essa ausência de efeito sobre uma das etapas da angiogênese poderia ser atribuída ao fato de que alguns mediadores angiogênicos não atuam diretamente no processo de proliferação, mas apenas atuam como segundo mensageiros na proliferação induzida por outros fatores de crescimento, tais como FGF (Deo *et al.* 2000). Além disso, a indução da migração de células endoteliais é apontada como uma característica distinta de citocinas angiogênicas (Carmeliet, 2000).

A presença do grupamento nitro na molécula de NO₂-FA foi apontada como essencial para o efeito observado na migração celular, uma vez que as moléculas de ácido graxo precursoras não demonstraram nenhum efeito significativo tanto sobre a migração como na proliferação de células endoteliais. Além disso, os efeitos dos lípides nitrados na migração celular foram inibidos de modo significante com o pré-tratamento de um seqüestrador de *NO, sugerindo, portanto, que os efeitos pró-angiogênicos de LNO₂ e OANO₂ poderiam ser mediados por mecanismos dependentes de *NO. De fato, estudos prévios têm demonstrado que os NO₂-FA podem atuar como sinalizadores celulares por meio da liberação de *NO (Lim *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2005; Schopfer *et al.*, 2005a, Trostchansky *et al.*, 2007).

Por sua vez, doadores sintéticos de *NO foram apontados como mediadores da angiogênese, especialmente por influenciar a proliferação e migração de células endoteliais (Heller *et al.*, 1999). Contudo, os efeitos descritos são controversos. Estudos demonstram que doadores de *NO podem inibir (Yang *et al.*, 1994; Gooch *et al.*, 1997; Sarkar *et al.*, 1995), estimular (Ziche *et al.*, 1993; Ziche *et al.*, 1994) ou mesmo não alterar (Arnal *et al.*, 1994) a proliferação de células endoteliais. Em relação à migração celular, efeitos discordantes também são apresentados. Essa discrepância poderia ser não somente devido às diferenças das linhagens de células endoteliais, mas também dependentes de condições

específicas de crescimento e, especialmente, da duração de exposição aos doadores. Por exemplo, Magazine e colaboradores (2000) demonstraram que 2h após a exposição à *NO, uma inibição na migração de monócitos era observada, ao passo que um estímulo na migração celular era detectado somente após 5h.

No entanto, os dados resultantes deste trabalho são consistentes com artigos prévios que descrevem a indução da migração de células endoteliais com doadores sintéticos de *NO, tais como esperminaNONOato e DETANONOato sob condições experimentais semelhantes às utilizadas (Powell *et al.*, 2000). Além disso, Kawasaki e colaboradores (2003) relatam resultados de magnitude similar aos apresentados nesse trabalho na migração de células endoteliais aórticas humanas tratadas com o doador de *NO S-nitroso-N-penicilamina na concentração de 10 μM.

Outros estudos corroboram o efeito indutivo de *NO sobre a migração celular e sugerem ainda que este efeito poderia ser conseqüência da S-nitrosilação de proteínas, bem como, via cascatas de sinalização dependentes de cGMP (Friebe e Koesling, 2003; Fukumura *et al.*, 2006). Por exemplo, a S-nitrosilação de Ras estimula sua atividade, resultando em migração aumentada de células endoteliais (Oliveira *et al.*, 2003). Segundo Kawasaki e colaboradores (2003) o *NO pode ainda estimular a migração celular via ativação da cascata de sinalização VEGFR-2/PI3K/Akt-PKB.

Interessantemente, a produção basal de *NO em nossas células endoteliais foi insuficiente para modular a migração celular, o que foi evidenciado pelo pré-tratamento com L-NMMA. A inibição da oxido nítrico sintase resultou em mudanças não significativas, tanto no grupo controle, como na migração celular induzida por LNO₂ (1-10 μM) quando comparado ao grupo tratado com LNO₂ que não recebeu pré-tratamento, sugerindo que os efeitos dos NO₂-FA foram independentes do *NO endógeno.

Esses resultados vão ao encontro de dados prévios indicando que, devido ao fato das células endoteliais produzirem baixos níveis de *NO via eNOS, a liberação de *NO de reservatórios tais como S-nitrosotióis ou NO₂-FA aumentariam a biodisponibilidade de *NO de maneira não enzimática, promovendo conseqüentemente a neovascularização (Al-Ani *et al.*, 2006).

Os efeitos biológicos dos NO₂-FA explorados neste trabalho também foram evidenciados em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Nossos dados indicam que os NO₂-FA podem induzir o brotamento e formação de novos vasos em concentrações similares às descritas previamente como moduladoras da migração celular. Igualmente nesses modelos, concentrações equivalentes de seus precursores, ácido linoléico e ácido oléico, não demonstraram qualquer efeito significativo. De fato, um estudo anterior relatou que ácidos graxos como ácido linoléico e ácido linolênico não haviam demonstrado efeito sobre o brotamento de novos vasos no modelo de anel de aorta (Go *et al.*, 2003).

A participação de *NO nos efeitos observados com LNO₂ e OANO₂ foi esclarecida pelos pré-tratamentos com o seqüestrador de *NO, c-PTIO, e o inibidor da eNOS, L-NMMA. Como visto no ensaio de migração celular, os efeitos dos NO₂-FA foram completamente inibidos com o pré-tratamento com c-PTIO, quando comparado ao grupo controle sem pré-tratamento, sugerindo que os efeitos observados poderiam ser também mediados por mecanismos dependentes de *NO. Assim, a inibição da eNOS além de afetar o brotamento espontâneo de novos vasos no grupo controle, também influenciou de modo significativo os efeitos induzidos pelos NO₂-FA. Desse modo, pode-se especular que o *NO endógeno poderia favorecer um efeito sinérgico no efeito demonstrado com o tratamento com LNO₂.

A modulação da expressão de proteínas pró e anti-angiogênicas é fundamental para o processo angiogênico (Carmeliet, 2003) e poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos pró-angiogênicos dos NO₂-FA. Inúmeros fatores de crescimento, fatores de

transcrição bem como citocinas são apontados como mediadores angiogênicos (Bergers e Benjamin, 2003). Dentre eles, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) possui um papel chave na angiogênese por regular a proliferação, a migração e a sobrevivência das células endoteliais (Olsson *et al.*, 2003). Segundo relatos prévios, a sensibilidade das células endoteliais à sinalização de VEGF é exemplificada pelas anormalidades vasculares letais resultantes da deleção de apenas um alelo de VEGF em camundongo (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Outros moduladores angiogênicos também afetam a proliferação e função de células endoteliais (Distler *et al.*, 2003). Todavia, a maioria desses fatores atua em outros tipos celulares e não agem como reguladores independentes da angiogênese e das funções das células endoteliais, apenas complementando (ou coordenando) a sinalização de VEGF (Wang *et al.*, 2008).

Diversos genes pró-angiogênicos avaliados neste trabalho, tais como VEGFR2, FGF, PDGF, MMP2 e MMP9 não foram estimulados pelos NO₂-FA. Entretanto, o tratamento com LNO₂ 10 μM induziu um aumento na atividade gelatinolítica de MMP9. As MMPs desempenham um papel crítico no remodelamento proteolítico da matriz extracelular e na geração de moléculas bioativas durante o processo de angiogênese (Coussens e Werb, 2002; Egeblad e Werb, 2002). Além disso, o efeito induzido pelo tratamento com LNO₂ na atividade de MMP-9 foi inibido pelo pré-tratamento com o seqüestrador de *NO sugerindo que o LNO₂ poderia induzir a atividade de MMP-9 via mecanismo dependente de *NO.

Segundo Ridnour e colaboradores (2007), concentrações baixas do doador de *NO esperminaNONOato (≅ 1-10 μM) aumentam a atividade da MMP9 em cultura de macrófagos. Uma vez que a migração celular e o brotamento de novos vasos em anéis de aorta de rato induzidos por *NO mostraram-se dependentes da atividade desta MMP, os mesmos autores sugerem que a MMP9 poderia atuar como mediador dos efeitos próangiogênicos do *NO.

Embora a expressão gênica de mediadores angiogênicos não tenha sido alterada pelos NO₂-FA, nossos dados indicam a indução da expressão de VEGF pelos NO₂-FA em duas linhagens de células endoteliais. Apesar da observação do efeito ter diferido nos tempos de incubação, curiosamente a magnitude foi similar em ambas as linhagens. Vale ressaltar ainda que, em células HUVEC, diferentes NO₂-FAs apresentaram tempos de ativação distintos, quando o efeito sobre a expressão de VEGF foi examinado. De fato, uma vez que os NO₂-FA têm sido demonstrados como compostos instáveis em ambientes aquosos (Schopfer *et al.*, 2005b), estudos recentes relatam diferenças na potência dos efeitos, bem como na meia vida observados com LNO₂ e OANO₂ (Baker *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2008).

Devido à expressão de VEGF induzida pelos NO₂-FA ser inibida de modo significativo com o pré-tratamento de um seqüestrador de *NO, os achados descritos neste trabalho apontam que a liberação de *NO estaria contribuindo para o efeito indutivo dos NO₂-FA sobre a expressão de VEGF. Esse resultado corrobora com uma série de trabalhos que descrevem a indução de VEGF com doadores sintéticos de *NO (Chin et al., 1997; Xiong et al., 1998; Frank et al., 1999a e 1999b; Shizukuda et al., 1999; Dulak et al., 2000; Kimura et al., 2000; Palmer et al., 2000; Sandau et al., 2001; Jozkowicz et al., 2001; Kimura et al., 2002). No entanto, nosso trabalho teve limitações na detecção da secreção de VEGF, onde metodologias diferentes apresentaram resultados controversos. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer este ponto.

É possível que o fator de transcrição HIF-1α possa ser ativado com os NO₂-FA, uma vez que doadores de *NO tem sido descritos como indutores dessa proteína (Kimura *et al.*, 2000, Palmer *et al.*, 2000; Sandau *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2002) e os efeitos próangiogênicos demonstrados pelos NO₂-FA sejam dependentes de *NO. Desse modo, a ativação de HIF-1α poderia levar a uma expressão aumentada de VEGF com o tratamento dos NO₂-FA. Corroborando essa possibilidade, nossos dados demonstram que os NO₂-FA

aumentaram não somente a estabilidade de HIF-1α (levando a um acúmulo da proteína) como também os níveis de RNAm via mecanismo dependente de *NO.

Similar aos efeitos demonstrados para a expressão com VEGF, ambos LNO $_2$ e OANO $_2$, induziram a proteína e o RNAm de HIF-1 α em tempos distintos. Sandau e colaboradores (2003) descreveram anteriormente que doadores de *NO com meia-vida diferentes apresentam efeitos dependentes do tempo de incubação e da concentração destes sobre a ativação de HIF-1 α . Desse modo, doadores de *NO com meia-vida curta induziram uma resposta rápida de HIF-1 α , enquanto doadores lentos de *NO demonstraram efeitos tardios no acúmulo de HIF-1 α .

A despeito da dependência de *NO ser evidenciada no efeito dos NO₂-FA sobre HIF-1α, não é possível especularmos o mecanismo exato pelo qual os NO₂-FA poderiam induzir o HIF-1α. Isso se deve ao fato de mecanismos diversos serem descritos para doadores de *NO. Segundo Brune e Zhou (2007), doadores de *NO podem bloquear a atividade das prolil-hidroxilases (Metzen *et al.*, 2003), impedindo a degradação de HIF-α, como também ativar rotas de sinalização que ativam a transcrição/tradução de HIF-1α (Kasuno *et al.*, 2004) ou regular sua estabilidade por meio de S-nitrosilação (Sumbayev *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Desse modo, somente estudos adicionais poderiam elucidar o mecanismo envolvido na ativação de HIF-1α pelos NO₂-FA.

Ainda que o mecanismo específico de atuação dos NO₂-FA sobre HIF-1α não tenha sido determinado, nossos dados descrevem o envolvimento direto desse fator de transcrição nos efeitos pró-angiogênicos dos NO₂-FA. Conforme apresentado na seção de resultados, o silenciamento de HIF-1α aboliu de modo significativo os efeitos indutivos dos NO₂-FA sobre a migração de células endoteliais bem como sobre a expressão de VEGF. Portanto, esses dados evidenciam que os efeitos pró-angiogênicos dos NO₂-FA seriam mediados pela ativação de HIF-1α. Nossos resultados estão de acordo com um estudo recente

demonstrando que o silenciamento de HIF- 1α inibe a migração de macrófagos estimulada por doadores de *NO. Segundo os achados desse estudo, o HIF- 1α ativado por doadores de *NO poderia induzir a migração celular também através do aumento dos níveis de RNAm de Cdc42 e Rac1, levando à modulação de actina do citoesqueleto.

Portanto, o conjunto dos dados obtidos neste trabalho demonstra, pela primeira vez, que os NO₂-FA estimulam a migração bem como o brotamento de células endoteliais via mecanismos dependentes de *NO. A exploração dos mecanismos pelos quais os LNO₂ e OANO₂ atuam no processo angiogênico demonstrou que os NO₂-FA aumentam a atividade da MMP9, os níveis de RNAm de VEGF e a ativação de HIF-1α também via mecanismos dependentes de *NO. Em última instância, a análise dos mecanismos de ação dos NO₂-FA também apontou que o fator de transcrição HIF-1α possui um papel chave na indução de VEGF pelos NO₂-FA, o que levaria aos efeitos pró-angiogênicos observados neste trabalho. Desse modo, nossos achados enfatizam que a ativação de HIF-1α pelos NO₂-FA é um mecanismo importante de sinalização no processo angiogênico. Além disso, os lípides nitrados podem constituir importantes alvos para a intervenção terapêutica objetivando a inibição ou estímulo do processo de angiogênese, processo associado a diversas doenças e apontado como fator crucial da instabilidade de placas ateroscleróticas.

6.0 Conclusões

A partir dos dados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- Os lípides nitrados derivados dos ácido linoléico e do ácido oléico não alteram a proliferação e viabilidade celular das células endoteliais das linhagens HUVEC e EA.hy926 em concentrações entre 0,001 e 10 μM;
- LNO₂ e OANO₂ 10 μM induzem a migração celular de células HUVEC via mecanismo dependente da liberação de *NO dos NO₂-FA, porém, independente da síntese endógena de *NO;
- LNO₂ e OANO₂ estimulam o brotamento de novos vasos em um modelo *ex vivo* de cultura de anéis de aorta de rato. Mecanismos dependentes de *NO podem ser responsáveis por este efeito. Contudo, a participação do *NO endógeno demonstra efeito sinérgico com o *NO liberado a partir dos NO₂-FA;
- NO₂-FA induzem o processo de angiogênico em modelo in vivo de membrana corioalantóica de embrião de galinha;
- NO₂-FA aumentam de modo significativo os níveis de expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células endoteliais das linhagens HUVEC e
 EA.hy926 por mecanismos dependentes de *NO;
- A atividade da metaloprotease 9 (MMP9) secretada em meio de cultura de células HUVEC é aumentada significativamente com o tratamento com LNO $_2$ 10 μ M;

- NO_2 -FA induzem não só os níveis de RNAm, como também o acúmulo da proteína HIF- 1α em células endoteliais HUVEC e EA.hy926. A liberação de *NO a partir das moléculas de NO_2 -FA desempenha um papel importante neste efeito;
- Os efeitos pró-angiogênicos dos NO₂-FA sobre a migração de células endoteliais bem como sobre os níveis de RNAm de VEGF são dependentes da sinalização do fator de transcrição HIF-1.

7.0 Referências Bibliográficas

- Acker, T. and K.H. Plate. 2002. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J. Mol. Med.* **80**: 562-575.
- Adams,R.H. and K.Alitalo. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 464-478.
- 3. Al-Ani,B., P.W.Hewett, S.Ahmed, M.Cudmore, T.Fujisawa, S.Ahmad, and A.Ahmed. 2006. The release of nitric oxide from S-nitrosothiols promotes angiogenesis. *PLoS. ONE.* **1**: e25.
- Alexander,R.L., D.J.Bates, M.W.Wright, S.B.King, and C.S.Morrow. 2006. Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrolinoleic acid-induced, PPARgamma-dependent transcription activation. *Biochemistry* **45**: 7889-7896.
- Alexander, R.L., M.W.Wright, M.J.Gorczynski, P.K.Smitherman, T.E.Akiyama, H.B.Wood, J.P.Berger, S.B.King, and C.S.Morrow. 2009. Differential potencies of naturally occurring regioisomers of nitrolinoleic acid in PPARgamma activation. *Biochemistry* **48**: 492-498.
- Antonov,A.S., F.D.Kolodgie, D.H.Munn, and R.G.Gerrity. 2004. Regulation of macrophage foam cell formation by alphaVbeta3 integrin: potential role in human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **165**: 247-258.
- Arnal, J.F., J.Yamin, S.Dockery, and D.G.Harrison. 1994. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am. J. Physiol* **267**: C1381-C1388.
- Axelrad, T.W., D.D.Deo, P.Ottino, K.J.Van, N.G.Bazan, H.E.Bazan, and J.D.Hunt. 2004. Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. *FASEB J.* **18**: 568-570.
- Baker, P.R., Y.Lin, F.J.Schopfer, S.R.Woodcock, A.L.Groeger, C.Batthyany, S.Sweeney, M.H.Long, K.E.Iles, L.M.Baker, B.P.Branchaud, Y.E.Chen, and B.A.Freeman. 2005. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 280: 42464-42475.

- Baker, P.R., F.J. Schopfer, V.B.O'Donnell, and B.A. Freeman. 2009. Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. Free Radic. Biol. Med. 46: 989-1003.
- Baker, P.R., F.J. Schopfer, S. Sweeney, and B.A. Freeman. 2004. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**: 11577-11582.
- Balazy, M., T.lesaki, J.L.Park, H.Jiang, P.M.Kaminski, and M.S.Wolin. 2001. Vicinal nitrohydroxyeicosatrienoic acids: vasodilator lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**: 611-619.
- Barger, A.C., R.Beeuwkes, III, L.L.Lainey, and K.J.Silverman. 1984. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 310: 175-177.
- Barrett, T.B. and E.P.Benditt. 1988. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**: 2810-2814.
- Batthyany, C., F.J. Schopfer, P.R. Baker, R. Duran, L.M. Baker, Y. Huang, C. Cervenansky, B.P. Branchaud, and B.A. Freeman. 2006. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**: 20450-20463.
- Bergers,G. and L.E.Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 401-410.
- Bobik, A., A. Agrotis, P. Kanellakis, R. Dilley, A. Krushinsky, V. Smirnov, E. Tararak, M. Condron, and G. Kostolias. 1999. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* **99**: 2883-2891.
- Bochkov, V.N., M.Philippova, O.Oskolkova, A.Kadl, A.Furnkranz, E.Karabeg, T.Afonyushkin, F.Gruber, J.Breuss, A.Minchenko, D.Mechtcheriakova, P.Hohensinner, K.Rychli, J.Wojta, T.Resink, P.Erne, B.R.Binder, and N.Leitinger. 2006. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 99: 900-908.
- Brahimi-Horn,M.C. and J.Pouyssegur. 2009. HIF at a glance. *J. Cell Sci.* **122**: 1055-1057. Bruckdorfer,R. 2005. The basics about nitric oxide. *Mol. Aspects Med.* **26**: 3-31.

- Bruick,R.K. and S.L.McKnight. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-1340.
- Brune,B. and J.Zhou. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha under the control of nitric oxide. *Methods Enzymol.* **435**: 463-478.
- Burk,R.R. 1973. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**: 369-372.
- 23. Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**: 389-395.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**: 653-660.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**: 932-936.
- Carmeliet, P. and D. Collen. 1999. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237: 133-158.
 - Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.
- Carrero, P., K.Okamoto, P.Coumailleau, S.O'Brien, H.Tanaka, and L.Poellinger. 2000. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell Biol.* 20: 402-415.
- Celletti,F.L., J.M.Waugh, P.G.Amabile, A.Brendolan, P.R.Hilfiker, and M.D.Dake. 2001. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 7: 425-429.
- Chen, L., C.A.Bosworth, T.Pico, J.F.Collawn, K.Varga, Z.Gao, J.P.Clancy, J.A.Fortenberry, J.R.Lancaster, Jr., and S.Matalon. 2008. DETANO and nitrated lipids increase chloride secretion across lung airway cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39: 150-162.
- Chin,K., Y.Kurashima, T.Ogura, H.Tajiri, S.Yoshida, and H.Esumi. 1997. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **15**: 437-442.

- Coles, B., A.Bloodsworth, S.R.Clark, M.J.Lewis, A.R.Cross, B.A.Freeman, and V.B.O'Donnell. 2002a. Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ. Res.* 91: 375-381.
- 33. Coles,B., A.Bloodsworth, J.P.Eiserich, M.J.Coffey, R.M.McLoughlin, J.C.Giddings, M.J.Lewis, R.J.Haslam, B.A.Freeman, and V.B.O'Donnell. 2002b. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. J. Biol. Chem. 277: 5832-5840.
- Couffinhal, T., M.Kearney, B.Witzenbichler, D.Chen, T.Murohara, D.W.Losordo, J.Symes, and J.M.Isner. 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am. J. Pathol.* **150**: 1673-1685.
- Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* **438**: 937-945.
- 36. Coussens, L.M. and Z.Werb. 2002. Inflammation and cancer. Nature 420: 860-867.
- Cui, T., F.J.Schopfer, J.Zhang, K.Chen, T.Ichikawa, P.R.Baker, C.Batthyany, B.K.Chacko, X.Feng, R.P.Patel, A.Agarwal, B.A.Freeman, and Y.E.Chen. 2006. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* 281: 35686-35698.
- Damert, A., E.Ikeda, and W.Risau. 1997. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem. J.* **327 (Pt 2)**: 419-423.
- Davies, M.J., P.D.Richardson, N.Woolf, D.R.Katz, and J.Mann. 1993. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* **69**: 377-381.
- 40. Denizot,F. and R.Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**: 271-277.
- 4. Deo,D.D., T.W.Axelrad, E.G.Robert, V.Marcheselli, N.G.Bazan, and J.D.Hunt. 2002. Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a

- mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**: 21237-21245.
- U. Dickson, M.C., J.S. Martin, F.M. Cousins, A.B. Kulkarni, S. Karlsson, and R.J. Akhurst. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854.
- Distler, O., M.Neidhart, R.E.Gay, and S.Gay. 2002. The molecular control of angiogenesis. *Int. Rev. Immunol.* **21**: 33-49.
- цц. Donnini,S. and M.Ziche. 2002. Constitutive and inducible nitric oxide synthase: role in angiogenesis. *Antioxid. Redox. Signal.* **4**: 817-823.
- Dulak, J., A. Jozkowicz, A. mbinska-Kiec, I. Guevara, A. Zdzienicka, D. Zmudzinska-Grochot, I. Florek, A. Wojtowicz, A. Szuba, and J. P. Cooke. 2000. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 659-666.
- Egeblad,M. and Z.Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2: 161-174.
- Eiserich, J.P., R.P.Patel, and V.B.O'Donnell. 1998. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* **19**: 221-357.
- Elvert,G., A.Kappel, R.Heidenreich, U.Englmeier, S.Lanz, T.Acker, M.Rauter, K.Plate, M.Sieweke, G.Breier, and I.Flamme. 2003. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* 278: 7520-7530.
- 49. Faine, L.A., D.M. Cavalcanti, M.Rudnicki, S.Ferderbar, S.M. Macedo, H.P. Souza, S.H. Farsky, L.Bosca, and D.S. Abdalla. 2009. Bioactivity of nitrolinoleate: effects on adhesion molecules and CD40-CD40L system. *J. Nutr. Biochem*.
- Favier, J., H.Kempf, P.Corvol, and J.M.Gasc. 2001. Coexpression of endothelial PAS protein 1 with essential angiogenic factors suggests its involvement in human vascular development. *Dev. Dyn.* **222**: 377-388.

- Ferrara, N., K.Carver-Moore, H.Chen, M.Dowd, L.Lu, K.S.O'Shea, L.Powell-Braxton, K.J.Hillan, and M.W.Moore. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**: 439-442.
- Ferrara, N., H.P.Gerber, and J.LeCouter. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**: 669-676.
- §3. Ferreira, A.M., M.I.Ferrari, A.Trostchansky, C.Batthyany, J.M.Souza, M.N.Alvarez, G.V.Lopez, P.R.Baker, F.J.Schopfer, V.O'Donnell, B.A.Freeman, and H.Rubbo. 2009. Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem. J.* 417: 223-234.
- Finlayson-Pitts, B.J., L.L.Sweetman, and B.Weissbart. 1987. A Fourier transform infrared spectrometry study of the reactions of phosphatidylcholines with gaseous N2O5 and NO2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **89**: 438-448.
- Folkman,J. 1984. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* **51**: 601-604.
- Folkman,J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1: 27-31.
- 5.7. Fong,G.H., J.Rossant, M.Gertsenstein, and M.L.Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**: 66-70.
- 58. Fraisl,P., M.Mazzone, T.Schmidt, and P.Carmeliet. 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* **16**: 167-179.
- Frank,S., B.Stallmeyer, H.Kampfer, N.Kolb, and J.Pfeilschifter. 1999a. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* **13**: 2002-2014.
- Frank,S., B.Stallmeyer, H.Kampfer, C.Schaffner, and J.Pfeilschifter. 1999b. Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like-tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. *Biochem. J.* **338 (Pt 2)**: 367-374.
- Freeman, B.A., P.R.Baker, F.J.Schopfer, S.R.Woodcock, A.Napolitano, and M.d'Ischia. 2008.

 Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem*.

- (2) Friebe, A. and D. Koesling. 2003. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.* **93**: 96-105.
- Friedlander, M., P.C.Brooks, R.W.Shaffer, C.M.Kincaid, J.A.Varner, and D.A.Cheresh. 1995.

 Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* **270**: 1500-1502.
- Fruhwirth, G.O., A.Moumtzi, A.Loidl, E.Ingolic, and A.Hermetter. 2006. The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 1060-1069.
- Fukumura, D., S.Kashiwagi, and R.K.Jain. 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 521-534.
- Gaengel, K., G.Genove, A.Armulik, and C.Betsholtz. 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 630-638.
- Galis, Z.S., G.K.Sukhova, M.W.Lark, and P.Libby. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest* **94**: 2493-2503.
- Gallon,A.A. and W.A.Pryor. 1993. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids* 28: 125-133.
- Gallon, A.A. and W.A. Pryor. 1994. The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids* **29**: 171-176.
- Gamble, J.R., J.Drew, L.Trezise, A.Underwood, M.Parsons, L.Kasminkas, J.Rudge, G.Yancopoulos, and M.A.Vadas. 2000. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ. Res.* 87: 603-607.
- Gerber, H.P., F. Condorelli, J.Park, and N.Ferrara. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**: 23659-23667.
- Gerhardt, H., M.Golding, M.Fruttiger, C.Ruhrberg, A.Lundkvist, A.Abramsson, M.Jeltsch, C.Mitchell, K.Alitalo, D.Shima, and C.Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161: 1163-1177.

- Fig. Giaccia, A., B.G.Siim, and R.S.Johnson. 2003. HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 803-811.
- Go,R.S., E.L.Ritman, and W.G.Owen. 2003. Angiogenesis in rat aortic rings stimulated by very low concentrations of serum and plasma. *Angiogenesis*. **6**: 25-29.
- Gooch, K.J., C.A.Dangler, and J.A.Frangos. 1997. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J. Cell Physiol* 171: 252-258.
- Grazia, L.M., A.Zanetti, M.Corada, T.Takahashi, G.Balconi, F.Breviario, F.Orsenigo, A.Cattelino, R.Kemler, T.O.Daniel, and E.Dejana. 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* **161**: 793-804.
- Griffioen,A.W. and G.Molema. 2000. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* **52**: 237-268.
- Hanahan, D. and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
- Harrington, E.O., J.Loffler, P.R.Nelson, K.C.Kent, M.Simons, and J.A.Ware. 1997. Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7390-7397.
- Heil, M., I. Eitenmuller, T. Schmitz-Rixen, and W. Schaper. 2006. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell Mol. Med.* **10**: 45-55.
- Heller, R., T.Polack, R.Grabner, and U.Till. 1999. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis* **144**: 49-57.
- Hellstrom, M., H.Gerhardt, M.Kalen, X.Li, U.Eriksson, H.Wolburg, and C.Betsholtz. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **153**: 543-553.
- Hellstrom, M., L.K.Phng, J.J.Hofmann, E.Wallgard, L.Coultas, P.Lindblom, J.Alva, A.K.Nilsson, L.Karlsson, N.Gaiano, K.Yoon, J.Rossant, M.L.Iruela-Arispe, M.Kalen, H.Gerhardt, and C.Betsholtz. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**: 776-780.

- g4. Heussen, C. and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in
 polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Anal.

 Biochem. 102: 196-202.
- Hirschi, K.K., S.A.Rohovsky, and P.A.D'Amore. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* **141**: 805-814.
- Hobson,B. and J.Denekamp. 1984. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br. J. Cancer* **49**: 405-413.
- Horowitz, A. and M. Simons. 2008. Branching morphogenesis. Circ. Res. 103: 784-795.
- Hughes, S.E., D.Crossman, and P.A.Hall. 1993. Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc. Res.* 27: 1214-1219.
- Ichikawa, T., J.Zhang, K.Chen, Y.Liu, F.J.Schopfer, P.R.Baker, B.A.Freeman, Y.E.Chen, and T.Cui. 2008. Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: a critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology* **149**: 4086-4094.
- R.R.Schleef, H.D.Glogar, and I.M.Lang. 1999. Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: In vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2340-2347.
- Iivanainen, E., L.Nelimarkka, V.Elenius, S.M.Heikkinen, T.T.Junttila, L.Sihombing, M.Sundvall, J.A.Maatta, V.J.Laine, S.Yla-Herttuala, S.Higashiyama, K.Alitalo, and K.Elenius. 2003. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *FASEB J.* 17: 1609-1621.
- P.R.Baker, A.Agarwal, and B.A.Freeman. 2009. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid mediates protective effects through regulation of the ERK pathway. Free Radic. Biol. Med. 46: 866-875.

- পু ৪, Iruela-Arispe,M.L. and G.E.Davis. 2009. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev. Cell* **16**: 222-231.
- 44. Isenberg, J.S., L.A.Ridnour, E.M.Perruccio, M.G.Espey, D.A.Wink, and D.D.Roberts. 2005. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**: 13141-13146.
- Jeong, J.W., M.K.Bae, M.Y.Ahn, S.H.Kim, T.K.Sohn, M.H.Bae, M.A.Yoo, E.J.Song, K.J.Lee, and K.W.Kim. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709-720.
- Jones, M.K., K.Tsugawa, A.S.Tarnawski, and D.Baatar. 2004. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 520-528.
- Jozkowicz, A., J.P.Cooke, I.Guevara, I.Huk, P.Funovics, O.Pachinger, F.Weidinger, and J.Dulak. 2001. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc. Res.* **51**: 773-783.
- Kaelin, W.G., Jr. and P.J.Ratcliffe. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* **30**: 393-402.
- Kaipainen, A., J.Korhonen, T.Mustonen, H.van, V, G.H.Fang, D.Dumont, M.Breitman, and K.Alitalo. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**: 3566-3570.
- Kallio, P.J., K.Okamoto, S.O'Brien, P.Carrero, Y.Makino, H.Tanaka, and L.Poellinger. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* **17**: 6573-6586.
- Kalluri,R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.

 Nat. Rev. Cancer 3: 422-433.
- Kamei,M., W.B.Saunders, K.J.Bayless, L.Dye, G.E.Davis, and B.M.Weinstein. 2006. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**: 453-456.
- Kappel,A., V.Ronicke, A.Damert, I.Flamme, W.Risau, and G.Breier. 1999. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 93: 4284-4292.

- Kasuno,K., S.Takabuchi, K.Fukuda, S.Kizaka-Kondoh, J.Yodoi, T.Adachi, G.L.Semenza, and K.Hirota. 2004. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **279**: 2550-2558.
- Kawasaki,K., R.S.Smith, Jr., C.M.Hsieh, J.Sun, J.Chao, and J.K.Liao. 2003. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* **23**: 5726-5737.
- Kimura, H., T.Ogura, Y.Kurashima, A.Weisz, and H.Esumi. 2002. Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**: 976-982.
- Kimura,H., A.Weisz, Y.Kurashima, K.Hashimoto, T.Ogura, F.D'Acquisto, R.Addeo, M.Makuuchi, and H.Esumi. 2000. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* **95**: 189-197.
- Kimura,H., A.Weisz, T.Ogura, Y.Hitomi, Y.Kurashima, K.Hashimoto, F.D'Acquisto, M.Makuuchi, and H.Esumi. 2001. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 276: 2292-2298.
- (9-10): 1317-1325. Kobayashi, T. 1983. Chemosphere 12 (9-10): 1317-1325.
- Kolodgie, F.D., H.K.Gold, A.P.Burke, D.R.Fowler, H.S.Kruth, D.K.Weber, A.Farb, L.J.Guerrero, M.Hayase, R.Kutys, J.Narula, A.V.Finn, and R.Virmani. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.* **349**: 2316-2325.
- Kourembanas, S., L.P.McQuillan, G.K.Leung, and D.V.Faller. 1993. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J. Clin. Invest* **92**: 99-104.
- Ku,D.D., J.K.Zaleski, S.Liu, and T.A.Brock. 1993. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol* **265**: H586-H592.
 - Kumamoto,M., Y.Nakashima, and K.Sueishi. 1995. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum. Pathol.* **26**: 450-456.

- Langheinrich, A.C., M.Kampschulte, T.Buch, and R.M.Bohle. 2007. Vasa vasorum and atherosclerosis Quid novi? *Thromb. Haemost.* **97**: 873-879.
- Langheinrich, A.C., A.Michniewicz, D.G.Sedding, G.Walker, P.E.Beighley, W.S.Rau, R.M.Bohle, and E.L.Ritman. 2006. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 347-352.
- Lappalainen, H., P.Laine, M.O.Pentikainen, A.Sajantila, and P.T.Kovanen. 2004. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1880-1885.
- Leber, T.M. and F.R. Balkwill. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.* **249**: 24-28.
- Lee,S., S.M.Jilani, G.V.Nikolova, D.Carpizo, and M.L.Iruela-Arispe. 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* **169**: 681-691.
- Li,F., P.Sonveaux, Z.N.Rabbani, S.Liu, B.Yan, Q.Huang, Z.Vujaskovic, M.W.Dewhirst, and C.Y.Li. 2007. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol. Cell* **26**: 63-74.
- Li,J., M.Post, R.Volk, Y.Gao, M.Li, C.Metais, K.Sato, J.Tsai, W.Aird, R.D.Rosenberg, T.G.Hampton, F.Sellke, P.Carmeliet, and M.Simons. 2000. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat. Med.* **6**: 49-55.
- Li,Y., J.Zhang, F.J.Schopfer, D.Martynowski, M.T.Garcia-Barrio, A.Kovach, K.Suino-Powell, P.R.Baker, B.A.Freeman, Y.E.Chen, and H.E.Xu. 2008. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 865-867.
- Licht, A.H., F.Muller-Holtkamp, I.Flamme, and G.Breier. 2006. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development. *Blood* **107**: 584-590.
- Lim,D.G., S.Sweeney, A.Bloodsworth, C.R.White, P.H.Chumley, N.R.Krishna, F.Schopfer, V.B.O'Donnell, J.P.Eiserich, and B.A.Freeman. 2002. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 15941-15946.

- Lima, E.S., M.G.Bonini, O.Augusto, H.V.Barbeiro, H.P.Souza, and D.S.Abdalla. 2005. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol. Med.* **39**: 532-539.
- Lima, E.S., M.P.Di, and D.S.Abdalla. 2003. Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **44**: 1660-1666.
- Lima, E.S., M.P.Di, H.Rubbo, and D.S.Abdalla. 2002. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**: 10717-10722.
- Livak, K.J. and T.D.Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lupia, E., A.Pucci, P.Peasso, M.Merlo, P.Baron, C.Zanini, S.L.Del, S.Rizea-Savu, L.Silvestro, M.Forni, G.Emanuelli, G.Camussi, and G.Montrucchio. 2003. Intra-plaque production of platelet-activating factor correlates with neoangiogenesis in human carotid atherosclerotic lesions. *Int. J. Mol. Med.* 12: 327-334.
- Lupu,F., D.A.Heim, F.Bachmann, M.Hurni, V.V.Kakkar, and E.K.Kruithof. 1995. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1444-1455.
- Ma,H., T.M.Calderon, J.T.Fallon, and J.W.Berman. 2002. Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **164**: 79-87.
- Magazine, H.I., J.Chang, Y.Goumon, and G.B.Stefano. 2000. Rebound from nitric oxide inhibition triggers enhanced monocyte activation and chemotaxis. *J. Immunol.* **165**: 102-107.
- Mazzone, M., D.Dettori, O.R.Leite de, S.Loges, T.Schmidt, B.Jonckx, Y.M.Tian, A.A.Lanahan, P.Pollard, A.C.Ruiz de, S.F.De, S.Vinckier, J.Aragones, K.Debackere, A.Luttun, S.Wyns, B.Jordan, A.Pisacane, B.Gallez, M.G.Lampugnani, E.Dejana, M.Simons, P.Ratcliffe, P.Maxwell, and P.Carmeliet. 2009. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* **136**: 839-851.
- Metzen, E., J.Zhou, W.Jelkmann, J.Fandrey, and B.Brune. 2003. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol. Biol. Cell* **14**: 3470-3481.

- Moreno, P.R., E. Falk, I.F. Palacios, J.B. Newell, V. Fuster, and J.T. Fallon. 1994. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* **90**: 775-778.
- Moulton, K.S., E.Heller, M.A.Konerding, E.Flynn, W.Palinski, and J.Folkman. 1999. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **99**: 1726-1732.
- Moulton, K.S., K.Vakili, D.Zurakowski, M.Soliman, C.Butterfield, E.Sylvin, K.M.Lo, S.Gillies, K.Javaherian, and J.Folkman. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**: 4736-4741.
- Nadtochiy,S.M., P.R.Baker, B.A.Freeman, and P.S.Brookes. 2009. Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic preconditioning: implications for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **82**: 333-340.
- Nakata,A., J.Miyagawa, S.Yamashita, M.Nishida, R.Tamura, K.Yamamori, T.Nakamura, S.Nozaki, K.Kameda-Takemura, S.Kawata, N.Taniguchi, S.Higashiyama, and Y.Matsuzawa. 1996. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation* **94**: 2778-2786.
- Nicosia, R.F. and A.Ottinetti. 1990. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* **63**: 115-122.
- O'Donnell, V.B., J.P. Eiserich, P.H. Chumley, M.J. Jablonsky, N.R. Krishna, M. Kirk, S. Barnes, V.M. rley-Usmar, and B.A. Freeman. 1999. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. Chem. Res. Toxicol. 12: 83-92.
- Oh,S.P., T.Seki, K.A.Goss, T.Imamura, Y.Yi, P.K.Donahoe, L.Li, K.Miyazono, D.P.ten, S.Kim, and E.Li. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 2626-2631.
- Oliveira, C.J., F.Schindler, A.M.Ventura, M.S.Morais, R.J.Arai, V.Debbas, A.Stern, and H.P.Monteiro. 2003. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-

- stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 381-396.
- Olsson,A.K., A.Dimberg, J.Kreuger, and L.Claesson-Welsh. 2006. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 359-371.
- Palmer, L.A., B.Gaston, and R.A.Johns. 2000. Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol. Pharmacol.* **58**: 1197-1203.
- Peet,D. and S.Linke. 2006. Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis. Found. Symp.* **272**: 37-49.
- Phng,L.K. and H.Gerhardt. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* **16**: 196-208.
- Powell, J.A., S.N.Mohamed, J.S.Kerr, and S.A.Mousa. 2000. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J. Cell Biochem.* **80**: 104-114.
- Pryor,W.A. and J.W.Lightsey. 1981. Mechanisms of Nitrogen Dioxide Reactions: Initiation of Lipid Peroxidation and the Production of Nitrous Acid. *Science* **214**: 435-437.
- Pugh, C.W. and P.J.Ratcliffe. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**: 677-684.
- Rajagopalan,S., X.P.Meng, S.Ramasamy, D.G.Harrison, and Z.S.Galis. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest* 98: 2572-2579.
- Richard, D.E., E.Berra, E.Gothie, D.Roux, and J.Pouyssegur. 1999. p42/p44 mitogenactivated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 32631-32637.
- Ridnour, L.A., J.S.Isenberg, M.G.Espey, D.D.Thomas, D.D.Roberts, and D.A.Wink. 2005. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**: 13147-13152.
- Ridnour, L.A., A.N. Windhausen, J.S. Isenberg, N. Yeung, D.D. Thomas, M.P. Vitek, D.D. Roberts, and D.A. Wink. 2007. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity

- by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**: 16898-16903.
- 155, Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**: 671-674.
- Ruhrberg, C. 2003. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. Bioessays 25: 1052-1060.
- Sandau, K.B., J.Zhou, T.Kietzmann, and B.Brune. 2001. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J. Biol. Chem.* **276**: 39805-39811.
- Sarkar,R., R.C.Webb, and J.C.Stanley. 1995. Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. *Surgery* **118**: 274-279.
- Sato,Y. and D.B.Rifkin. 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* **109**: 309-315.
- Schofield, C.J. and P.J.Ratcliffe. 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 343-354.
- 1 6 1. Schopfer, F.J., P.R.Baker, G.Giles, P.Chumley, C.Batthyany, J.Crawford, R.P.Patel, N.Hogg, B.P.Branchaud, J.R.Lancaster, Jr., and B.A.Freeman. 2005a. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. J. Biol. Chem. 280: 19289-19297.
- Schopfer, F.J., Y.Lin, P.R.Baker, T.Cui, M.Garcia-Barrio, J.Zhang, K.Chen, Y.E.Chen, and B.A.Freeman. 2005b. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 2340-2345.
- Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3: 721-732.
- Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**: 983-985.
- Shalaby,F., J.Rossant, T.P.Yamaguchi, M.Gertsenstein, X.F.Wu, M.L.Breitman, and A.C.Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**: 62-66.

- Shima, D.T., M.Kuroki, U.Deutsch, Y.S.Ng, A.P.Adamis, and P.A.D'Amore. 1996. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J. Biol. Chem.* 271: 3877-3883.
- Shizukuda,Y., S.Tang, R.Yokota, and J.A.Ware. 1999. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ. Res.* **85**: 247-256.
- Siekmann, A.F. and N.D.Lawson. 2007. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh. Migr.* **1**: 104-106.
- Soldi,R., S.Mitola, M.Strasly, P.Defilippi, G.Tarone, and F.Bussolino. 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO* J. 18: 882-892.
- Suchting, S., C.Freitas, N.F.Ie, R.Benedito, C.Breant, A.Duarte, and A.Eichmann. 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**: 3225-3230.
- Sumbayev, V.V., A.Budde, J.Zhou, and B.Brune. 2003. HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Lett.* **535**: 106-112.
- Thurston,G., J.S.Rudge, E.Ioffe, H.Zhou, L.Ross, S.D.Croll, N.Glazer, J.Holash, D.M.McDonald, and G.D.Yancopoulos. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* **6**: 460-463.
- Tian,H., S.L.McKnight, and D.W.Russell. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**: 72-82.
- 194. Tomanek,R.J. and G.C.Schatteman. 2000. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat. Rec.* **261**: 126-135.
- Tronc,F., Z.Mallat, S.Lehoux, M.Wassef, B.Esposito, and A.Tedgui. 2000. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: E120-E126.
- Trostchansky,A., J.M.Souza, A.Ferreira, M.Ferrari, F.Blanco, M.Trujillo, D.Castro, H.Cerecetto, P.R.Baker, V.B.O'Donnell, and H.Rubbo. 2007. Synthesis, isomer

- characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**: 4645-4653.
- Urbich, C., A.Reissner, E.Chavakis, E.Dernbach, J.Haendeler, I.Fleming, A.M.Zeiher, M.Kaszkin, and S.Dimmeler. 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J.* **16**: 706-708.
- Villacorta, L., J.Zhang, M.T.Garcia-Barrio, X.L.Chen, B.A.Freeman, Y.E.Chen, and T.Cui. 2007. Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **293**: H770-H776.
- Virmani,R., F.D.Kolodgie, A.P.Burke, A.V.Finn, H.K.Gold, T.N.Tulenko, S.P.Wrenn, and J.Narula. 2005. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 2054-2061.
- Wang,G.L., B.H.Jiang, E.A.Rue, and G.L.Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**: 5510-5514.
- Wang,S., X.Li, M.Parra, E.Verdin, R.Bassel-Duby, and E.N.Olson. 2008. Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**: 7738-7743.
- Williams, J.K., M.L.Armstrong, and D.D.Heistad. 1988. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ. Res.* **62**: 515-523.
- Wright, M.M., F.J.Schopfer, P.R.Baker, V.Vidyasagar, P.Powell, P.Chumley, K.E.Iles, B.A.Freeman, and A.Agarwal. 2006. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 4299-4304.
- YS4. Xiong,M., G.Elson, D.Legarda, and S.J.Leibovich. 1998. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am. J. Pathol.* **153**: 587-598.
- tor. Xu,W., L.Z.Liu, M.Loizidou, M.Ahmed, and I.G.Charles. 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* **12**: 311-320.

- Yang, W., J.Ando, R.Korenaga, T.Toyo-oka, and A.Kamiya. 1994. Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1160-1167.
- Yasinska,I.M. and V.V.Sumbayev. 2003. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **549**: 105-109.
- 188. Zamir, M. and M.D.Silver. 1985. Vasculature in the walls of human coronary arteries. Arch. Pathol. Lab Med. 109: 659-662.
- Zhou, J., N.Dehne, and B.Brune. 2009. Nitric oxide causes macrophage migration via HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42/Rac1. *Free Radic. Biol. Med.*
- Ziche, M. and L. Morbidelli. 2000. Nitric oxide and angiogenesis. J. Neurooncol. 50: 139-148.
- Ziche,M., L.Morbidelli, E.Masini, S.Amerini, H.J.Granger, C.A.Maggi, P.Geppetti, and F.Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J. Clin. Invest* **94**: 2036-2044.
- Ziche,M., L.Morbidelli, E.Masini, H.Granger, P.Geppetti, and F.Ledda. 1993. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 1198-1203.
- Ziche, M., A.Parenti, F.Ledda, P.Dell'Era, H.J.Granger, C.A.Maggi, and M.Presta. 1997. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ. Res.* **80**: 845-852.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CEEA nº 47 /2006

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Neoangiogênese na aterosclerose: modulação por lípides nitrados" (Protocolo CEEA n°102), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Martina Rudnick e do orientador(a) Prof^a.Dr^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, 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 em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/07/2006.

São Paulo, 10 de julho de 2006.

Prof^a. Dr^a. Lígfa Ferreira Gomes Presidente da CEEA