UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo dos efeitos da LDL (-) na angiogênese em modelos
in vitro e *in vivo*

Laila Abicair Sangaletti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Dulcinéia S. P. Abdalla

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo dos efeitos da LDL (-) na angiogênese em modelos
in vitro e *in vivo*

Laila Abicair Sangaletti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Dulcinéia S. P. Abdalla

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013408

Ficha Catalográfica

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

S225e Sangaletti, Laila Abicair
Estudo dos efeitos da LDL (-) na angiogênese em modelos
in vitro e in vivo / Laila Abicair Sangaletti. -- São Paulo,
2008.
98p.

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

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Lipídio : Bioquímica clínica I. T. II. Abdalla, Dulcinéia
Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Laila Abicair Sangaletti

Estudo dos efeitos da LDL (-) na angiogênese em modelos
in vitro e *in vivo*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico este meu trabalho aos personagens mais importantes da minha vida:
A Deus por minha vida e por tudo o que sou, inclusive por permitir que eu chegasse
até o fim;

A minha família, meu pai Antenor e minha mãe Sônia, a quem devo também minha
vida, por me alimentarem e me educarem com tanto amor. Com especial carinho à
minha mãe que dedicou sua vida às filhas. E, é claro, à minha irmã Eliza pelo amor e
carinho, apesar das brigas naturais entre irmãs;

A meu noivo, Cassiano, por ter sido minha força nos momentos de fraqueza, pela
paciência quando estive a beira da loucura, e principalmente, por acreditar em mim
como nunca ninguém acreditou.

AGRADECIMENTOS

- A Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla pela oportunidade e por ter tornado possível um sonho;
- Aos meus professores colaboradores, Prof. Dr. Roger Chammas e Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan, que se prontificaram a auxiliar na realização deste trabalho, disponibilizando seus laboratórios e atenção em todos os momentos necessários;
- As pessoas que fazem e fizeram parte do Laboratório de Bioquímica Clínica: Andréia, Adriano, Bianca, Carol, Cris, Dani, Débora, Elaine, Evellyne, Julie, Leonor, Luciane, Renato, Simone, Tanize, Themis e Vivian por sempre encontrarem uma forma de ajudar e, principalmente, pela amizade indispensável, por nossas conversas úteis e fúteis e desabafos pessoais e profissionais. Com um especial agradecimento a Dani que disponibilizou seu tempo para ler minha dissertação e me auxiliar nas correções. A Tâmara com sua ajuda indispensável nos experimentos de Zimografia e *Protein Array* e a Martina por ter me ensinado e auxiliado no experimento de anéis de aorta;
- As amigas que conquistei durante este trabalho e que são muito especiais para mim: Keila, Vanuska e Mara.
- Aos integrantes do Laboratório de Hematologia Clínica: a Profa. Dra. Primavera por disponibilizar seu laboratório sempre que necessário; aos alunos Amanda, Karina e Marcelo pela atenção e disposição a ajudar sempre que preciso; e ao Chico, com especial carinho, por ter sido tão solidário e me acompanhado na leitura das amostras em citômetro, mas principalmente pela amizade;
- As meninas da Sala de Lavagem: Cármem, Claudinha, Dorlei, Rose, Suzana. Obrigado, meninas pela amizade! Quão boas foram nossas conversas e tão bem me fizeram nossas risadas. Com carinho especial a Claudinha que se tornou uma grande amiga e confidente e sempre torceu por mim;

- Ao Mau (Maurício) pela grande amizade cultivada, por ter mostrado-me os primeiros passos para a realização deste trabalho, por ter me acompanhado desde o início e por ser um ouvinte, confidente e aconselhador;
- As meninas da secretária: Ana, Dora, Edna e Sueli pela atenção e paciência. Com carinho especial a Edna por nossas conversas sobre dança de salão e por sua companhia até a estação de trem;
- A meu amigo forrozeiro Paulo por ter se proposto a fazer as análises estatísticas deste trabalho;
- A todas aquelas pessoas que conheci ao longo deste trabalho que foram muitas e que com certeza esquecerei de citar alguma, mas que não são menos importantes para mim.
- A CAPES pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1.0. INTRODUÇÃO	01
1.1. Angiogênese	01
1.1.1. Fatores que estimulam a angiogênese	02
1.1.1.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	02
1.1.1.2. Angiopoietinas (Ang)	04
1.1.1.3. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	05
1.1.1.4. Fatores indiretos	06
1.1.1.5. Metaloproteinases (MMPs)	07
1.1.2. Fatores que inibem a angiogênese	08
1.1.2.1. Citocinas	09
1.1.2.2. Angiostatina	09
1.1.2.3. Endostatina	11
1.1.2.4. Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)	13
1.1.2.5. Fatores que reduzem a resposta de fatores de crescimento	13
1.1.2.5.1. Hipercolesterolemia	14
1.1.2.5.1.1. Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa: LDL (-)	16
2.0. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Purificação da LDL total, LDL nativa e LDL (-) do plasma	19
3.1.1. Obtenção da LDL total do plasma por ultracentrifugação seqüencial	19
3.1.2. Separação da LDL nativa e LDL (-) da LDL total por cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC)	20

3.1.3. Eletroforese de lipoproteínas	22
3.2. Ensaio para a avaliação da citotoxicidade da LDL (-)	23
3.2.1. Cultura de células	23
3.2.2. Viabilidade celular	23
3.2.3. Morte celular	23
3.3. Ensaio para a avaliação do efeito da LDL (-) na angiogênese <i>in vitro</i>	24
3.3.1. Zimografia	24
3.3.2. Ensaio de cicatrização	26
3.3.3. Ciclo celular	26
3.3.4. Anéis de aorta	28
3.3.5. <i>Protein array</i>	29
3.4. Ensaio para a avaliação do efeito da LDL (-) na angiogênese <i>in vivo</i>	30
3.4.1. Membrana corioalantóica de galinha (CAM)	30
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Avaliação da citotoxicidade da LDL (-) para células endoteliais	32
4.2. Efeitos da LDL (-) na angiogênese <i>in vitro</i>	35
4.2.1. Degradação da matriz extracelular	35
4.2.2. Migração celular	42
4.2.3. Proliferação celular	44
4.2.4. Formação de túbulos	49
4.2.5. Secreção de fatores pró- e anti- angiogênicos por células endoteliais	51
4.2.5.1. Fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos	51
4.2.5.2. Citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune	57
4.2.5.3. Fragmentos de proteínas resultantes da proteólise da matriz extracelular	65
4.3. Efeitos da LDL (-) na angiogênese <i>in vivo</i>	67
4.3.1. Membrana corioalantóica de galinha (CAM)	67
5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6.0. CONCLUSÕES	69
7.0. ANEXOS	70
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA: asymmetric dimethylarginine
Ang: Angiopoietina
APS: Persulfato de amônio
BHT: Hidroxitoluenobutilado
CAM: Membrana corioalantóica de galinha
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
CSPG: Proteoglicana sulfato condroitina
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF: Fator de crescimento epidérmico
EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico
ENA-78: Fator ativador de célula epitelial derivado de neutrófilo -78
ENO: Esperminanonoato
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR: Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
FPLC: Cromatografia líquida de rápido desempenho
G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
GRO: *Growth-related oncogene*
HCl: Ácido clorídrico
Hepes: (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic Acid])
HIF-1 α : Fator induzível pela hipóxia
HSPGs: Proteoglicanas sulfato de heparana
HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM: molécula de adesão intracelular
IFN: Interferons
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina
IL: Interleucina
I-TAC: *Interferon-inducible T-cell α -chemoattractant*

KBr: Brometo de potássio
KCl: Cloreto de potássio
 KH_2PO_4 : Fosfato de potássio dibásico
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LDL (-): Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LPS: Lipopolissacarídeo
MCP: Proteína quimiotática para monócitos
M-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos
MEM: Meio Essencial Mínimo
MMPs: Metaloproteinases
MT1-MMP: metaloproteinase tipo membrana
NaCl : Cloreto de sódio
 NaHCO_3 : Bicarbonato de sódio
 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: Fosfato de sódio bibásico dodecaidrato
NK: natural killer
NaOH: Hidróxido de sódio
NOS: óxido nítrico sintetase
PA: ativador de plasminogênio
PAIs: Inibidores do ativador de plasminogênio
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM : Molécula de adesão plaquetária de células endoteliais
PGK : Fosfoglicerato quinase
PI: Iodeto de propídio
PLGF: Fator de crescimento placentário
PMSF: Phenylmethanesulfonylfluoride
RANTES: *Regulated on activation normal T-cell-expressed and secreted*
SDS: Natriumlauryl-sulfat
SIN-1: 3-morfolinossidnonimina
TEMED: Tetramethylethylenediamine
 $\text{TGF-}\beta$: Fator transformador de crescimento beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma referente à purificação de LDL nativa e LDL (-) por FPLC.	21
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose para lipoproteínas.	22
Figura 3: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na morte e viabilidade de células endoteliais.	34
Figura 4: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na atividade de MMPs e seus zimógenos precursores.	39
Figura 5: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de MMP-1, MMP-9 e u-PAR por células endoteliais.	40
Figura 6: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de TIMP-1 e TIMP-2 por células endoteliais.	41
Figura 7: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na migração de células endoteliais.	43
Figura 8: Efeito da LDL nativa e LDL (-) no ciclo celular de células endoteliais.	47
Figura 9: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na proliferação de células endoteliais.	48
Figura 10: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na formação de túbulos por células endoteliais em uma matriz de colágeno.	50
Figura 11: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de fatores de crescimento e outros fatores envolvidos na angiogênese.	55
Figura 12: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de Ang-1, Ang-2, Tie-2 e receptores para VEGF (VEGFR-2 e -3) por células endoteliais.	56
Figura 13: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune.	63
Figura 14: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune.	64
Figura 15: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de Angiostatina e Endostatina por células endoteliais.	66
Figura 16: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na angiogênese <i>in vivo</i> .	67

SANGALETTI, L.A. **ESTUDO DOS EFEITOS DA LDL (-) NA ANGIOGÊNESE EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Diversas doenças estão associadas com a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, ou angiogênese. Dentre elas está a aterosclerose (Griffioen & Molema, 2000). Pesquisas recentes demonstram que a hipercolesterolemia, que têm um papel importante na fisiologia da aterosclerose, também pode prejudicar a ação de fatores angiogênicos (Jang et.al., 2000). A hipercolesterolemia que é decorrente de um aumento de LDL no plasma ocasiona um aumento no tempo de permanência desta partícula na circulação (Yasunobu, 2001). Contudo, a LDL pode sofrer modificação na circulação, dando origem a uma subfração mais eletronegativa da LDL, a LDL (-). A LDL (-) pode prejudicar cada etapa da angiogênese, desregulando a função endotelial (Tai et. al., 2006). Em nosso estudo, vimos que apesar da LDL (-) ter estimulado a migração celular, esta partícula inibiu a formação de túbulos *in vitro*. A LDL (-) não foi capaz de afetar a angiogênese *in vivo*.

Palavras Chaves: angiogênese, angiopoietinas, angiostatina, citocinas, endostatina, fatores de crescimento, FGF, LDL (-), LDL oxidada, MMP, TIMP, VEGF.

SANGALETTI, L.A. **STUDY OF THE LDL (-) EFFECTS IN THE ANGIOGENESIS IN MODELS *IN VITRO* AND *IN VIVO***. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A large number of diseases is associated with formation of new blood vessels out of pre-existing capillaries, or angiogenesis. These diseases include the atherosclerosis (Griffioen & Molema, 2000). Recent researches demonstrate that the hypercholesterolemia, that have a important role in the physiology of the atherosclerosis, can impaired the angiogenesis (Jang et. al., 2000). The hypercholesterolemia that is decurrente of high levels of LDL in the plasma causes an increase in the time of permanence this particle in the circulation (Yasunobu, 2001). However, the LDL can to suffer modification in the circulation, giving rise to a subfraction more electronegative from LDL, the LDL (-). The LDL (-) could impair each one of the steps of the angiogenesis, thereby dysregulating endothelial function (Tai et. al., 2006). In our study, see that despite the LDL (-) have stimulated the cell migration, this particle inhibited the Tube formation *in vitro*. The LDL (-) didn't affect the angiogenesis *in vivo*.

Key Words: angiogenesis, angiopoietin, angiostatin, cytokine, endostatin, growth factors, FGF, LDL (-), oxidized LDL, MMP, TIMP, VEGF.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Angiogênese

A angiogênese é um processo biológico de germinação de células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos (Bian et. al., 2004). A formação de novos vasos ocorre em resposta às necessidades metabólicas e é observado em diversas circunstâncias, tais como, reparo de lesões (Folkman & Shing, 1992; Griffioen & Molema, 2000; Winlaw, 1997), reprodução (Folkman & Shing, 1992), desenvolvimento (Folkman & Shing, 1992) e proliferação celular (Winlaw, 1997), sendo caracterizado pela dependência do suprimento de oxigênio e de nutrientes (Griffioen & Molema, 2000). Sob condições fisiológicas, a angiogênese é altamente regulada. Contudo, existem condições fisiológicas nas quais a angiogênese não ocorre sob estreita regulação, que são encontradas no sistema reprodutivo feminino e durante a cicatrização de ferimentos (Hyder & Stancel, 1999). A angiogênese pode ocorrer em processos não fisiológicos, que são dependentes da angiogênese não regulada e persistente (Folkman & Shing, 1992).

Diversas doenças estão associadas com a formação de novos vasos, nas quais a angiogênese excessiva faz parte da patologia. Estas doenças incluem o câncer (tumores sólidos e hematológicos), doenças cardiovasculares (aterosclerose), inflamações crônicas (artrite reumatóide, doença de Crohn), diabetes (retinopatia diabética), psoríase, endometriose e obesidade (Griffioen & Molema, 2000).

O processo da angiogênese consiste de muitos estágios que incluem a estimulação de células endoteliais, a degradação subsequente da matriz extracelular por enzimas proteolíticas seguido pela invasão da matriz extracelular, migração e proliferação de células endoteliais e, finalmente, a formação de novos capilares. Eventualmente, o recrutamento de células periendoteliais (pericitos) estabiliza a cadeia de capilares formados (Carmeliet, 2000).

Moléculas angiogênicas específicas podem iniciar este processo, assim como, moléculas inibitórias específicas podem parar o processo (Folkman & Shing, 1992). A expressão desequilibrada de fatores pró - e anti - angiogênicos e seus receptores na célula endotelial determinará a geração e regressão de novos vasos sanguíneos. Dentre estes, os mais importantes fatores pró-angiogênicos incluem o

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), angiopoietina (Ang) e citocinas. Estes fatores iniciam a angiogênese por modular a migração e/ou proliferação de células endoteliais e a formação da nova vasculatura. Por outro lado, fatores anti-angiogênicos incluindo angiostatina, endostatina e vasostatina inibem várias vias da angiogênese (Bian et. al., 2004).

1.1.1. Fatores que estimulam a angiogênese

Uma variedade de agentes que estimulam a angiogênese têm sido descritos e podem ser divididos em três classes (Klagsbrun & Moses, 1999). A primeira classe consiste da família VEGF e angiopoietinas, que especialmente atuam em células endoteliais. A segunda classe contém moléculas que atuam de forma direta. O membro protótipo deste grupo é o FGF-2, que foi um dos primeiros peptídeos angiogênicos caracterizados. O terceiro grupo de moléculas angiogênicas incluem fatores que atuam indiretamente. Estes afetam a angiogênese resultando na liberação de fatores de macrófagos, células endoteliais e tumorais, que atuam diretamente na angiogênese. Os mais extensivamente estudados são o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e o fator transformador de crescimento beta ($\text{TGF-}\beta$) (Liekens et. al., 2001).

1.1.1.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Um dos fatores de crescimento mais estudados e mais potentes é o VEGF (Griffioen & Molema, 2000). Está expresso em diferentes tecidos, incluindo o cérebro, os rins, o fígado e baço e em muitos tipos de células (Veikkola & Alitalo, 1999). Foi detectado no ovário, durante a formação do corpo lúteo (Ferrara et. al., 1998) e no útero, durante o crescimento de vasos endometriais e no local de implantação do embrião. Altas concentrações de VEGF foram também detectadas durante a fase proliferativa do processo de cicatrização de ferimentos (Nissen et. al., 1998). É igualmente detectado em locais onde as células endoteliais são quiescentes, tais como no coração, fígado e cérebro, desempenhando o papel de fator de sobrevivência. Também desempenha função em muitos dos cânceres humanos, retinopatia diabética, artrite reumatóide e aterosclerose (Ferrara, 1999; Inoue et. al., 1998).

O VEGF pertence à família de VEGFs, que consiste de seis membros: VEGF-A (VEGF), Fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e vírus VEGF (VEGF-E) (Veikkola & Alitalo, 1999). VEGF-A, PLGF, VEGF-B e VEGF-E aparecem para exercer seus efeitos preferencialmente, mas não exclusivamente, em células endoteliais vasculares. VEGF-C e D por outro lado, atuam em células endoteliais linfáticas (Gerwins et. al., 2000).

O VEGF-A é a forma mais conhecida de VEGF. No mínimo, quatro isoformas são produzidas como um resultado de ajuste alternativo, contendo 121 (VEGF₁₂₁), 165 (VEGF₁₆₅), 189 (VEGF₁₈₉) e 206 (VEGF₂₀₆) aminoácidos (Ferrara et. al., 2003). As isoformas de VEGF diferem por suas afinidades à heparina e, portanto, apresentam diferentes potenciais angiogênicos, com o VEGF₁₆₅ significativamente mais potente do que o VEGF₁₂₁ (Annex & Simons, 2005). VEGF-A₁₆₅ é a isoforma biologicamente ativa tanto na angiogênese em condições fisiológicas quanto patológicas (Gerwins et. al., 2000). VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ são secretados no meio extracelular, enquanto VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ permanecem associados na célula ou na matriz celular devido à alta afinidade por sulfato de heparana (Annex & Simons, 2005).

Muitos tipos de células podem expressar VEGF-A, dependendo do seu envolvimento na condição patológica caracterizada pela angiogênese aumentada, tais como isquemia do miocárdio (Breier et. al., 1997), aterosclerose, artrite e crescimento tumoral (Folkman, 1995). Para algumas destas condições, a hipóxia atua como um importante indutor da expressão de VEGF-A (Gerwins et. al., 2000).

Os dois receptores tirosina -quinase específicos para VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1), são expressos no endotélio vascular, e em menor extensão em monócitos/ macrófagos e certos tipos de tumores. O VEGFR-3 (Flt-4), que se liga ao VEGF-C e VEGF-D, é principalmente expresso no endotélio linfático (Kaipainen et. al., 1995). A interação de VEGF com VEGFR-2 é importante para induzir a completa resposta biológica do VEGF. A dimerização do VEGFR-2 conduz ao aumento da permeabilidade, proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais (Griffioen & Molema, 2000). Outra ação importante mediada pelo VEGFR-2 no endotélio é a produção de óxido nítrico sintase (NOSe) (Kroll & Waltenberger, 1998) e a liberação de óxido nítrico (*NO) (Kroll & Waltenberger, 1999). O *NO estimula a migração e a proliferação de células endoteliais, sendo que

o efeito mitogênico do VEGF nas células endoteliais ocorre particularmente por este mecanismo (Morbidegli et. al., 1996).

O papel mais aparente do VEGFR-1 é a indução da migração de monócitos (Clausen et. al., 1996). Sua expressão é regulada pela hipóxia e elementos que se ligam ao fator induzível pela hipóxia (HIF-1 α) têm sido identificados no VEGFR-1 (Shibuya et. al., 1999). O VEGFR-2 não apresenta elementos responsivos à hipóxia, porém sua expressão pode ser induzida pela hipóxia em certas condições, de forma indireta, através do aumento da expressão de VEGF (Kremer et. al., 1997).

O VEGF é descrito como um potente agente indutor da migração e proliferação de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e modulação da trombogenicidade (Inoue et. al., 1998). O VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e A1 em células endoteliais humanas (Gerber et. al., 1998). Há fortes evidências que o VEGF seja um mitógeno para células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos (Conn et. al., 1990; Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Ferrara & Henzel, 1989; Plouet et. al., 1989). Estudos recentes têm demonstrado os efeitos mitogênicos do VEGF também em alguns tipos de células não endoteliais em cultura, tais como células epiteliais pigmentares da retina (Guerrin et. al., 1995), células do ducto pancreático (Oberge-Welsh et. al., 1997) e células de Schwann (Sondell et. al., 1999). O VEGF não induz a proliferação de alguns tipos de células, tais como células musculares lisas ou fibroblastos; no entanto, aumenta a migração de células musculares lisas (Ishida et. al., 2001).

1.1.1.2. Angiopietina (Ang)

Dois outros receptores específicos para as células endoteliais, chamados Tie 1 e Tie 2, foram identificados. Experimentos com camundongos *knockout* têm sugerido um papel para estes receptores na maturação dos vasos sanguíneos. Os ligantes para Tie-2 foram descobertos apenas recentemente: angiopietina 1 (Ang-1) e angiopietina 2 (Ang-2). Ambos ligam-se ao Tie-2, mas apenas a Ang-1 resulta na transdução de sinais e regulação da maturação de vasos sanguíneos (Suri et. al., 1996). Contudo, a Ang-2 é um antagonista natural da Ang-1 (Maisonpierre et. al., 1997).

In vitro, a Ang-1 inibe a apoptose, induz o início da angiogênese e estabiliza a organização da rede de células endoteliais (Koblizek et. al., 1998; Korpelainen &

Alitalo, 1998; Kwak et. al., 1999). Quando combinada com outros fatores angiogênicos, tais como, VEGF e suplementos de fatores de crescimento contendo FGF-1, a sobrevivência de células endoteliais e da rede vascular aumenta (Kwak et. al., 1999; Papapetropoulos et. al., 1999). Nenhuma resposta mitogênica de células endoteliais para Ang-1 pôde ser observada (Koblizek et. al., 1998; Witzenbichler et. al., 1998).

1.1.1.3. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

A família do FGF consiste de nove membros. Os fatores são designados de FGF-1 até FGF-9, enquanto os nomes FGF ácido e FGF básico são usados para FGF-1 e FGF-2, respectivamente, e o fator de crescimento de queratinócito (KGF) é comumente usado para FGF-7. Quatro membros da família são produtos oncogênicos: FGF-3, FGF-4, FGF-5 e FGF-6. FGF-8 é também conhecido como fator de crescimento induzido por andrógenos, enquanto FGF-9 é conhecido como fator ativador da glia (Galzie et. al., 1997).

A família FGF possui no mínimo 23 diferentes ligantes, que se ligam a muitos diferentes receptores, incluindo um total de quatro receptores tirosina-quinase (FGFR-1,2,3,4) e muitos co-receptores de baixa afinidade (Steiling & Werner, 2003).

Dos diferentes membros da família do FGF, FGF-1 e FGF-2, estão preferencialmente implicados na angiogênese (Friesel & Maciag, 1995). Muitos tipos diferentes de células, *in vitro* e *in vivo*, produzem FGF-1 e FGF-2 (Gerwins et. al., 2000).

O FGF-1 tem sido encontrado no cérebro, retina, matriz óssea e osteossarcomas (Gospodarowicz et. al., 1986; Thomas et. al., 1980). O FGF-2 tem sido isolado de uma variedade de fontes, incluindo tecido neural, pituitária, córtex adrenal, corpo lúteo e placenta (Esch et. al., 1985).

O FGF-2 também tem sido encontrado em fluido corpóreo de pacientes com grande massa tumoral (Malek et. al., 1997), o que permite ao tumor estimular o crescimento de vasos sanguíneos. FGF-2 é produzido por muitas células endoteliais *in vitro* e desempenha papel importante no crescimento e neovascularização do tumor sólido (Bredel et. al., 1997). Altos níveis de FGF-2 estão presentes em células endoteliais do sarcoma de Kaposi (Samaniego et. al., 1995) e nos hemangiomas proliferantes (Chang et. al., 1999), assim como no soro e urina (Nguyen, 1997) de

pacientes com carcinoma renal, ovariano, mamário e coloretal (Dirix et. al., 1997) e sarcoma de tecido mole (Graeven et. al., 1999). Também é encontrado em muitos tipos de células de cultura, incluindo fibroblastos, células endoteliais, musculares lisas e da glia (Liekens et. al., 2001). FGF-1 e FGF-2 atuam igualmente em células endoteliais quanto em células do músculo liso e estão envolvidos na estimulação da angiogênese, aterogênese (Waltenberger, 1997) e arteriogênese (Deindl et. al., 2003).

O FGF-2 induz a formação de vasos e modula a expressão de integrinas, a comunicação intercelular e a auto-regulação de VEGF e VEGFR-2 *in vitro* (Bussolino et. al., 1996; Hata et. al., 1999). A deficiência de FGF-2, desenvolvida em camundongos sem nenhum fenótipo evidente não afetou a organogênese, crescimento e ciclo reprodutivo. Porém, os camundongos com ausência de FGF-2 mostraram defeitos neurais e prejuízo na cicatrização (Ortega et. al., 1998).

1.1.1.4. Fatores Indiretos

No adulto, a angiogênese é principalmente estimulada pela hipóxia tecidual via ativação da expressão do fator induzível pela hipóxia (HIF-1 α), que serve para aumentar a transcrição do VEGF e seus receptores e aumentar a estabilidade do RNAm do VEGF (Annex & Simons, 2005; Marti & Risau, 1998). A hipóxia celular é reconhecida como o estímulo angiogênico mais potente. Em resposta à hipóxia e isquemia, citocinas de várias fontes são liberadas (Griffioen & Molema, 2000; Ladoux & Frelin, 1993). Os intermediários reativos do oxigênio, produzidos durante reperusão após isquemia, também causam um aumento na expressão de VEGF (Winlaw, 1997).

Citocinas e outros fatores de crescimento estão envolvidos na regulação da angiogênese, promovendo um balanço entre forças pró - e anti - angiogênicas (Winlaw, 1997). A expressão de VEGF *in vivo* é auto regulada por citocinas, tais como interleucina-12 (IL-12), trombospondina e interleucina-1 β (IL-1 β), e fatores de crescimento, tais como, TGF- β , FGF-2 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Inoue et. al., 1998; Winlaw, 1997).

Dos fatores que atuam indiretamente na angiogênese, os mais extensivamente estudados são TNF- α e TGF- β , que inibem a proliferação de células endoteliais *in vitro*. *In vivo*, o TGF- β induz a angiogênese e estimula a expressão de

TNF- α , FGF-2, PDGF e VEGF por células inflamatórias. TNF- α aumenta a expressão de VEGF e seus receptores, interleucina 8 (IL-8) e FGF-2 por células endoteliais, explicando assim sua propriedade angiogênica *in vivo* (Liekens et. al., 2001). Contudo, os mecanismos da participação do TNF- α na angiogênese não estão ainda completamente elucidados.

Acredita-se que células do sistema imune tais como monócitos/ macrófagos, linfócitos e mastócitos podem afetar o balanço pró - e anti - angiogênico. Os linfócitos T, por exemplo, ativam a expressão de várias metaloproteinases via CD40 em células endoteliais, desempenhando papel importante na proliferação de células endoteliais, visto que o processo de proliferação e invasão de células endoteliais é dependente da atividade cooperativa do sistema ativador de plasminogênio (PA) e de metaloproteinases (MMPs) (Griffioen & Molema, 2000).

1.1.1.5. Metaloproteinases (MMPs)

Macromoléculas da matriz extracelular são importantes para a criação do ambiente celular requerido durante o desenvolvimento e morfogênese (Nagase & Woessner, 1999; Sternlicht & Werb, 2001). Sendo a degradação da matriz extracelular essencial em muitos processos fisiológicos (Westermarck & Kahari, 1999), as metaloproteinases (MMPs), coletivamente chamadas de matrixinas, são proteinases que participam da degradação da matriz extracelular (Nagase & Woessner, 1999; Sternlicht & Werb, 2001).

Normalmente, as MMPs são expressas, apenas quando e onde são necessárias, para o remodelamento tecidual que acompanha vários processos, tais como, durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização, ossificação e durante o desenvolvimento placentário (Woessner, 1991). Em condições fisiológicas, a atividade das MMPs são precisamente reguladas em sua transcrição, ativação de zimógenos precursores, na interação com componentes específicos da matriz extracelular e por inibidores endógenos (Nagase & Woessner, 1999; Sternlicht & Werb, 2001). No entanto, a perda da regulação e conseqüente expressão aberrante de várias MMPs tem sido correlatada com condições patológicas, tais como, periodontites, artrite reumatóide, invasão de células tumorais e metástase (Woessner, 1991), aterosclerose, aneurismas, nefrites, úlceras e fibrose (Visse & Nagase, 2003).

O processo proteolítico da matriz extracelular pode ter um efeito estimulatório ou inibitório na angiogênese. A degradação da matriz extracelular por MMPs pode promover a angiogênese por estimular a migração de células endoteliais. Este efeito estimulatório na migração pode ser contribuído pela diminuição da densidade de proteínas da matriz extracelular e/ ou por expor locais dentro da matriz que promovam a migração (Sottile, 2004).

Porém, as MMPs contribuem para a angiogênese não apenas por degradar componentes da matriz extracelular, mas também por liberar fatores pró-angiogênicos ligados à matriz extracelular, tais como, FGF-2, VEGF e TGF β (Rundhaug, 2003).

As MMPs são uma família de, no mínimo, 17 endopeptidases dependentes de zinco, coletivamente capazes de degradar essencialmente todos os componentes da matriz extracelular (Kahari & Saarialho-Kere, 1997; Woessner, 1998). De acordo com o substrato específico e estrutura, membros desta família podem ser classificados dentro de subgrupos, como collagenases, estromalisinas, gelatinases, MMPs de membrana e outros. Em geral, MMPs contêm um peptídeo sinal, um propeptídeo, um domínio catalítico e uma hemopexina como domínio ligado ao domínio catalítico por um anel. O domínio hemopexina está ausente nas matrilisinas (MMP-7 e -26) e as gelatinases A e B, MMP-2 e -9, respectivamente, contêm fibronectina tipo II inserida dentro do domínio catalítico (Westermarck & Kahari, 1999). Ambas as gelatinases são abundantemente expressas em vários tumores malignos (Basset et. al., 1997). Estudos de imunohistoquímica da expressão de MMP-2 têm mostrado quantidade aumentada da enzima no epitélio neoplásico de mama, cólon e adenocarcinoma gástrico (Westermarck & Kahari, 1999). Estas são consideradas enzimas-chave para a invasão e metastase tumoral (Liabakk et. al., 1996) e a ausência dessas gelatinases prejudica a angiogênese em camundongos (Itoh et. al., 1998; 1999).

1.1.2. Fatores que inibem a angiogênese

Muitas das proteínas, polipeptídeos e peptídeos com atividade anti-angiogênicas são endogenamente produzidos durante situações fisiológicas ou patológicas e compreendem duas classes de moléculas: mediadores e reguladores da inflamação (citocinas) e fragmentos de proteínas resultantes da proteólise da

matriz extracelular (angiostatina e endostatina) (Ruegg et. al., 2006). Porém, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Rege et. al., 2005) e fatores que reduzem a resposta de fatores de crescimento (hipercolesterolemia) (Jang et.al., 2000) também estão envolvidos na inibição da angiogênese.

1.1.2.1. Citocinas

Interferons e IL-10 são exemplos de citocinas envolvidas na inibição da angiogênese.

Interferons (IFN) são polipeptídios naturais expressos pela maioria das células em resposta a infecções virais (IFN α e β) ou por células inflamatórias e imunes sob ativação (IFN γ) (Ruegg et. al., 2006). IFN α e β tem mostrado propriedade anti - angiogênica *in vitro* e *in vivo*, mediada por seus efeitos inibitórios sob fatores angionênicos e na proliferação de células musculares lisas (Puduvalli & Sawaya, 2000).

IL-10 é a citocina anti-inflamatória mais importante encontrada no sistema imune humano. É um potente inibidor de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2 e IFN- γ . IL-10 é também um potente desativador da síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (Opal & DePalo, 2007). A expressão aumentada de IL-10 em células tumorais foi reportada por inibir a angiogênese tumoral. A IL-10 tem a capacidade de bloquear a proliferação de células endoteliais microvasculares induzida por VEGF e FGF-2 *in vitro* e de bloquear a indução da formação microvasos. A IL-10 também é capaz de induzir a produção de TIMP-1 e reduzir a secreção de MMP-2 e MMP-9 por células tumorais (Ruegg et. al., 2006).

1.1.2.2. Angiostatina

Angiostatina é um polipeptídio endógeno inibidor da angiogênese. Este é um fragmento intrínseco de plasminogênio com 38 kDa e consiste dos três ou quatro primeiros domínios Kringle (K) do plasminogênio (K1-3 ou K1-4) (Rege et. al., 2005; Dass et. al., 2007).

A angisotatina é gerada pelo seguinte processo: o plaminogênio é clivado pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) ou ativador de plasminogênio

do tipo uroquinase (u-PA), dando origem a plasmina. Esta etapa é seguida pela redução da ponte dissulfeto no quinto domínio K (potencialmente por fosfoglicerato quinase [PGK]) que permite que uma serina protease clive plasmina, gerando K1-4½ que sofre clivagem por MMPs para gerar angiostatina (K1-4 ou K1-3) (Rege et. al., 2005).

Apesar destes domínios apresentarem 50% de homologia estrutural, K1 é o inibidor mais potente, enquanto K4 é virtualmente inativo na supressão do crescimento de células endoteliais vasculares. O domínio Kringle-5 do plasminogênio é também um potente inibidor da angiogênese (Dass et. al., 2007).

Muitos estudos demonstram que a angiostatina tem grande número de efeitos em células endoteliais (Soff, 2000). O primeiro efeito descrito foi a inibição da sua proliferação. Como efeitos adicionais temos a inibição da formação de túbulos por estas células em Matrigel e a inibição de sua migração (O'Reilly et. al., 1994).

Claesson-Welsh et. al. (1998), demonstraram que a angiostatina induz a apoptose de células endoteliais em cultura. É possível que a indução da apoptose seja responsável pela inibição da proliferação celular. Eles também demonstraram que nestas células a migração e a formação de túbulos induzidos por FGF-2 e VEGF foram inibidos pela angiostatina.

Quatro ligantes para angiostatina foram identificados: integrina $\alpha v \beta 3$, ATP sintase, angiomotina e a proteoglicana sulfato condroitina (CSPG) NG2 (Chekenya et. al., 2002; Moser et. al., 1999; Tarui et. al., 2001; Troyanovsky et. al., 2001).

Integrina $\alpha v \beta 3$ media a adesão celular para uma variedade de proteínas da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno degradado e vitronectina. Estudos vêm demonstrando que a angiostatina pode atuar com um antagonista da integrina $\alpha v \beta 3$ por ligar-se a esta e competitivamente inibir sua interação com proteínas da matriz, contudo reduzindo a adesão celular, que é necessária para a migração e sobrevivência de células endoteliais (Rege et. al., 2005; Tarui et. al., 2001).

A angiostatina apresenta a habilidade de ligar-se as subunidades α/β da ATP sintase. Sua interação com esta proteína responsável pela produção de ATP resulta na redução da fonte de energia celular e, contudo inibi o processo angiogênico (Moser et. al., 2001).

Outro ligante para a angiostatina, a angiomotina é uma célula de superfície associada a uma proteína de 72 kDa que é expressa em células endoteliais e em tecidos onde a angiogênese está ativa, como na placenta e em tumores sólidos (Zetter, 2001). Como outras proteínas associadas a superfície celular que podem ligar-se ao plasminogênio e seus derivados, angiomotina atua via interação proteína-proteína. Esta está co-localizada com uma proteína pró-migratória tirosina quinase citoplasmática para a lamelipodia levando a migração de células endoteliais. Células endoteliais da aorta de ratos transfectadas com angiomotina demonstrou aumento da migração, invasão e estabilização de túbulos formados *in vitro*. O tratamento destas células com angiostatina inibiu a migração e a formação de túbulos em Matrigel. Assim tem-se proposto que a angiostatina atua como um antagonista da angiomotina por bloquear a habilidade desta de interagir com outras proteínas pró-migratórias (Rege et. al., 2005).

Outro ligante para angiostatina é a NG2. Esta proteoglicana que está expressa em uma subpopulação de células de glioblastoma localizada adjacente a células endoteliais proliferantes apresenta um potencial mecanismo pelo qual o efeito anti-angiogênico da angiostatina pode ser bloqueado. Estudos sugerem que a NG2 expressa na superfície de células tumorais de glioblastoma liga-se a angiostatina seqüestrando-a e eliminando-a, assim inibindo seu efeito anti-angiogênico e promovendo a neovascularização (Chekenya et. al., 2002).

1.1.2.3. Endostatina

A endostatina é um fragmento endógeno da região carboxi-terminal de colágeno tipo XVIII com 20 kDa (Ruegg et. al., 2006).

A geração de endostatina é mediada por uma variedade de proteases, tais como catepsina L e MMPs, que clivam pontes de peptídeo dentro de uma região sensível a ação de proteases do domínio carboxi-terminal (Ruegg et. al., 2006).

A endostatina foi originalmente identificada por inibir a proliferação de células endoteliais capilares bovinas, mas não por afetar a proliferação de células de origem não endotelial, e também por inibir a angiogênese em modelo de membrana corioalantóica de galinha (CAM) (O'Reilly et. al., 1997).

Em células endoteliais vasculares a endostatina inibi a migração e promove apoptose (Dass et. al., 2007). Na apoptose, Dhanabal et. al. (1999) e Shichiri &

Hirata (2001), mostraram que a endostatina atua principalmente por reduzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL, tanto quanto de fatores envolvidos no crescimento, resultando no aumento de 15 a 30 vezes da taxa de apoptose destas células. A endostatina também induz a ativação de caspase 3, uma protease intracelular que resulta no processo de apoptose em células de mamíferos (Dass et. al., 2007).

A endostatina causa a diminuição de c-myc, uma proteína necessária na migração de células endoteliais (Shichiri & Hirata, 2001), e inibição da ciclina D, resultando na quiescência de células endoteliais na fase G1 (Hanai et. al., 2002).

Não há receptores capazes de mediar os efeitos biológicos da endostatina. Porém, a endostatina pode interagir com muitas moléculas da superfície celular, incluindo proteoglicanas sulfato de heparana (HSPGs), tais como glipicana, integrina $\alpha 5\beta 1$, tropomiosina e receptores de VEGF KDR/Flk-1 (Rege et. al., 2005).

Muitos estudos têm demonstrado que a endostatina interage com uma ou mais HSPG e assim inibindo a angiogênese. Como o fator de crescimento pró - angiogênico FGF-2 requer uma interação com HSPG a fim de otimizar o ajuste e atividade de seu receptor, a ligação de endostatina no HSPG pode teoricamente deslocar o FGF-2 de sua interação com HSPG, inibindo sua sinalização (Sasaki et al., 1999).

A interação de endostatina com glipicana é intrigante. As glipicanas são HSPGs que podem promover a sinalização de FGF-2 através de seu receptor FGFR-1 (Steinfeld et al., 1996). Em adição, a glipicana-1 que está aumentada em células endoteliais proliferantes de tumores de glioblastoma, promove a sinalização de FGF-2 nestas células (Qiao et. al., 2003). Portanto, em tumores de glioblastomas, a interação da endostatina com glipicana-1 pode inibir a sinalização de FGF-2 (Rege et. al., 2005).

A interação da endostatina com integrina $\alpha 5\beta 1$ tem sido mencionada como anti - angiogênica. Integrina $\alpha 5\beta 1$ promove a angiogênese e sua sinalização requer a interação com seu ligante fibronectina. A endostatina liga-se a integrina $\alpha 5\beta 1$ inibindo a adesão focal quinase e sinalização de Erk (Eriksson et. al., 2003; Sudhakar et. al., 2003). A ativação da adesão focal quinase é um dos eventos iniciais de sinalização que ocorre quando a integrina interage com seu ligante,

promovendo a migração, proliferação e sobrevivência celular (Hecker & Gladson, 2003).

Um outro potencial mecanismo para o efeito anti-angiogênico da endostatina é sua ligação com tropomiosina, capaz de afetar a integridade de microfilamentos e a motilidade celular (MacDonald et. al., 2001).

Por último a endostatina tem a capacidade de interagir com muitas moléculas pró-angiogênicas e bloquear sua função, tais como do receptor de VEGF, VEGFR-2 (KDR/Flk-1), e a ativação de MMP (Kim et al., 2002).

1.1.2.4. Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1, -2, -3, e -4) são outro grupo de inibidores endógenos. TIMPs (21 a 29 kDa) tem um domínio N- e C-terminal de aproximadamente 125 e 65 aminoácidos, respectivamente, com cada domínio contendo três pontes dissulfeto conservadas. O domínio N-terminal dobra como uma unidade separada e é capaz de inibir MMPs (Visse & Nagase, 2003).

TIMPs são conhecidos por ligarem-se diretamente a MMPs e inibirem sua atividade, tão bem quanto inibir a proliferação celular e reduzir a expressão de VEGF (Rege et. al., 2005).

A expressão aumentada de TIMP-1, -2 e -3 reduz o crescimento tumoral. TIMP-2 inibe o crescimento de células endoteliais induzido por FGF-2 (Visse & Nagase, 2003).

No entanto, a literatura sugere que TIMPs também tenham efeitos pró-angiogênicos. Por exemplo, por bloquear a atividade de MMPs, TIMPs bloqueiam a geração de angiostatina e endostatina mediada pela degradação da matriz extracelular por MMPs, TIMPs tem efeito anti-apoptótico e ligam-se a MMPs de membrana (MT1-MMP), auxiliando na ativação de pró-MMP-2 (Rege et. al., 2005).

1.1.2.5. Fatores que reduzem a resposta de fatores de crescimento

A ação de fatores de crescimento é fisiologicamente seguida por uma resposta celular e molecular específica. Se a ativação do fator de crescimento não é seguida por uma resposta celular, ou, se este não ativa propriamente a cascata de

sinalização, podemos chamar esta situação de erro na sinalização celular. Estes erros podem ocorrer em diferentes níveis: na interação entre ligante e receptor, que pode ser inibida; na atividade quinase do receptor, que pode ser alterada; na parte interna do receptor, que pode ser modificada e então tornar-se não funcional. Em adição, falhas na transdução de sinal pós-receptor podem ocorrer dentro da célula alvo. Há diferentes causas de falhas na transdução de sinal, tais como, causas metabólicas incluindo diabetes mellitus e anormalidades no perfil lipídico (hipercolesterolemia), infecções e inflamações, além de defeitos genéticos (Waltenberger, 2005).

1.1.2.5.1. Hipercolesterolemia

Pesquisas recentes demonstram que a hipercolesterolemia, que têm um papel importante na fisiologia da aterosclerose, também pode prejudicar a ação de fatores angiogênicos (Jang et.al., 2000).

A hipercolesterolemia é decorrente de um aumento de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma, ocasionando um aumento no tempo de sua permanência na circulação. No entanto, a LDL pode sofrer modificação na circulação, ou durante sua transferência através do endotélio para a camada íntima da parede do vaso, levando ao desenvolvimento de placa aterosclerótica (Yasunobu et. al., 2001).

Nas últimas décadas, diversas evidências indicam que o acúmulo de lipídios na parede da artéria é dependente da modificação de LDL (Yasunobu et. al., 2001). A LDL pode ser modificada pelos processos de oxidação, glicação, agregação, associação com proteoglicanos, ou incorporação com imunocomplexos (Navab et. al., 1996; Steinberg, 1997). Os mecanismos moleculares que iniciam a oxidação da LDL *in vivo* ainda são desconhecidos e podem ser mediados por vários sistemas como íons metálicos de transição, cobre e ferro, mieloperoxidases, $\cdot\text{NO}$, radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hipoclorito e irradiação ultravioleta (Berliner et. al., 1990; Hazell & Stocker, 1993; Heinecke et. al., 1984).

In vitro, a oxidação da LDL pode ser obtida por diversos sistemas oxidativos. Xavier (2003) investigou os efeitos da LDL oxidada por dois sistemas pela 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) e pela esperminanonoato (ENO). A LDL oxidada pela

ENO apresentou efeito citotóxico e inibitório da proliferação e motilidade espontânea de células endoteliais da artéria coronária humana. Efeitos que aumentaram conforme o tempo de oxidação. Contudo, a LDL oxidada pela SIN -1 exerceu efeitos deletérios às culturas de células endoteliais maiores do que a LDL oxidada pela ENO, apresentando maior toxicidade. A toxicidade da LDL oxidada pelo SIN-1 aumentou proporcionalmente ao tempo de oxidação e concentração. Na angiogênese, a LDL oxidada pela ENO apresentou efeito inibitório sobre o número de túbulos formados em todas as concentrações, demonstrando potencial citotóxico, sugerindo que a toxicidade da lipoproteína está associada à sua oxidação. No estudo, o efeito da LDL oxidada pela SIN-1 não foi avaliado na angiogênese.

A LDL modificada é considerada uma das principais causas de lesão ao endotélio e, secundariamente, à musculatura lisa vascular (Griendling & Alexander, 1997; Navab et. al., 1996). A LDL modificada por oxidação altera as funções da célula endotelial, modificando tanto a sua capacidade de prevenir a adesão celular como também as suas propriedades fibrinolíticas (Berliner & Heinecke, 1996; Chait & Heinecke, 1994).

A LDL oxidada tem a capacidade de aumentar a síntese de glicoproteínas de adesão (Brow & Goldstein, 1983; 1988); aumentar a liberação de fatores de crescimento e citocinas (Nathan & Stuehr, 1990); inibir a esterificação de colesterol em células endoteliais (Stary et. al., 1994); inibir a migração de monócitos do espaço subendotelial para o sangue (Rothe et. al., 1996); induzir a formação de imune-complexos na parede arterial (Hansson, 1997) e impedir a ação de moléculas com capacidade vasodilatadora, como o NO , inibindo sua síntese (Batlouni & Ramires, 1994). O NO derivado do endotélio desempenha um importante papel na ação de fatores angiogênicos. Os níveis endógenos do inibidor da NOS (ADMA) estão elevados em camundongos hipercolesterolêmicos e deficientes em apo E. Os níveis elevados de ADMA, localmente ou sisternicamente, prejudicam a angiogênese basal e estimulada por FGF-2 (Jang et. al., 2000).

Salomonsson et. al. (2003) demonstraram menor expressão de RNAm do VEGFR-1 em macrófagos expostos à LDL oxidada, assim como, a redução de ligantes do VEGF na superfície da membrana celular .

1.1.2.5.1.1. Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa: LDL (-)

Estudos pioneiros de Avogaro e colaboradores descreveram uma subfração mais eletronegativa da LDL, isolada por cromatografia de troca aniônica, que tem sido chamada de **LDL eletronegativa**, representada como **LDL (-)**. A LDL (-) apresenta menor conteúdo de vitamina E, aumentado de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados, apoB agregada, triglicerídeos, ácido siálico e apoproteínas E e CIII. O conteúdo aumentado de triglicerídeos, ácido siálico e apoproteínas tem sido considerado o maior determinante para a carga negativa da LDL (-) (De Castellarnau et. al., 2000; Sanchez-Quesada et. al., 2004).

A LDL (-) apresenta também maior migração eletroforética em gel de agarose, maior susceptibilidade à oxidação *in vitro*, maior quantidade de lipídios oxidados, hidroperóxidos e óxidos de colesterol, quando comparada a LDL nativa (Sevanian et. al., 1997).

Em indivíduos saudáveis a LDL (-) corresponde de 0,1 a 5 % da LDL presente no plasma, porém foi observado um aumento da sua concentração em pacientes com hipercolesterolemia (Vedie et. al., 1998; Sanches-Quesada et al., 1999), diabetes não insulino – dependente (Sanches-Quesada et al., 1996; Moro et. al., 1998) e na prática de exercícios exaustivos (Benitez et. al., 2002).

Controvérsias existem sobre a afinidade da LDL (-) ao receptor de LDL, sendo demonstrado que a LDL (-) apresenta afinidade similar, maior ou menor com o receptor da LDL. De qualquer forma, exibe baixa afinidade ao receptor scavenger (Sevanian et. al., 1997; De Castellarnau et. al., 2000).

A LDL (-) tem atividade pró-inflamatória mediada pelo aumento da liberação de citocinas por células endoteliais, como IL-6, IL-8 e MCP-1, que estão envolvidas no recrutamento de monócitos e leucócitos durante a fase inicial da aterogênese (De Castellarnau et. al., 2007).

A apoptose das células endoteliais é considerada como um evento importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. A LDL (-) é capaz de induzir apoptose em cultura de células endoteliais por inibição da transcrição do FGF-2, fator importante também na angiogênese. Este efeito pró-apoptótico confirma o efeito citotóxico da partícula para células endoteliais (Chen et. al., 2003).

Efeito também visualizado por Xavier (2003) em estudo com células endoteliais de artéria coronária humana, onde LDL (-) purificada do plasma humano

apresentou efeito citotóxico, além de anti-proliferativo, inibitório da migração espontânea e redutor no número de túbulos neoformados.

Contudo, a ativação das células endoteliais, um importante fator de iniciação da aterosclerose, é evento chave na angiogênese. A angiogênese é composta por muitos estágios distintos na biologia endotelial que inclui a secreção de metaloproteinases, migração, proliferação e formação de túbulos, onde a LDL (-) pode prejudicar cada um destes processos, desregulando a função endotelial (Tai et. al., 2006).

Considerando esses estudos, investigamos se o efeito da LDL (-) na angiogênese está atribuído predominantemente à sua citotoxicidade, ou, à sua capacidade em modular fatores pró - ou anti - angiogênicos. O esclarecimento desses mecanismos seria relevante pelo fato desta partícula de lipoproteína modificada ser formada em situações nas quais a angiogênese é um fator crucial para a progressão da doença, como na aterosclerose.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da LDL (-) na modulação de processos envolvidos na angiogênese.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o efeito citotóxico da LDL (-) em células endoteliais com a avaliação da viabilidade e morte celular;
- Verificar os efeitos da LDL (-) nos eventos que constituem o processo de angiogênese, utilizando sistemas *in vitro* (degradação da matriz extracelular, migração, proliferação e formação de túbulos);
- Avaliar os efeitos da LDL (-) na liberação de fatores pró- e anti- angiogênicos de células endoteliais por *Protein Array*;
- Confirmar os efeitos da LDL (-) em modelo da angiogênese *in vivo*, utilizando a membrana corioalantóica de galinha (CAM).

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Purificação da LDL total, LDL nativa e LDL (-) do plasma

Primeiramente, o sangue de voluntários hipercolesterolêmicos foi coletado em tubos contendo EDTA. O sangue obtido foi imediatamente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. Ao plasma foi adicionado um coquetel (5 µL/mL de plasma), contendo benzamidina 400 mM, PMSF 200 mM, BHT 4 mM e 400 µg/mL de aprotinina. Em seguida, o plasma foi submetido a ultracentrifugação seqüencial para obtenção da LDL total.

3.1.1. Obtenção da LDL total do plasma por ultracentrifugação seqüencial

Colocou-se o plasma em tubos de policarbonato de 10 mL (Sorvall) específicos para ultracentrifugação. Os tubos foram calibrados em balança semi-analítica com uma solução salina na densidade de 1,019 (31,56g de NaCl por litro) para a remoção da VLDL. Estes foram preenchidos até a marcação próxima a tampa, sem permitir a formação de bolhas. Em seguida, procedeu-se a ultracentrifugação em uma ultracentrifuga Sorvall, modelo Ultra Pro 80, com um rotor de ângulo fixo T-1270 a 55.000 rpm por 8 horas a 4°C. Após esse período, a VLDL flutuou, ficando visível com a formação de um halo branco e turvo na superfície. A VLDL foi cuidadosamente removida com uma pipeta Pasteur e descartada.

Para a obtenção da LDL o plasma sem VLDL teve sua densidade corrigida com Brometo de Potássio (KBr) para a densidade de 1,063 (densidade da LDL). A densidade do plasma sem VLDL foi medida por um densímetro Mettler Toledo, modelo DA-300, para definir a quantidade necessária de KBr a ser adicionado. A densidade definida pelo aparelho foi anotada e aplicada na fórmula descrita abaixo:

$$M_{\text{KBr}} = \frac{V_f (d_f - d_i)}{1 - 0,312 (d_f)}$$

M_{KBr} = massa de KBr a ser adicionada

V_f = volume total do plasma medido em proveta

d_f = densidade que se pretende (no caso o da LDL é de 1,063)

d_i = densidade inicial que foi determinada pelo densímetro

A quantidade de KBr determinado pela fórmula foi adicionado ao plasma sem VLDL. A densidade do plasma com KBr foi conferida para certificar-se que sua densidade estava realmente 1,063. O plasma com KBr foi colocado em tubos específicos para ultracentrífuga. Os tubos foram calibrados com salina de densidade 1,063 (101,83g de NaCl por litro) e ultracentrifugados a 55.000 rpm por 8 horas a 4°C.

Após a ultracentrifugação a LDL flutuou, e apareceu na superfície com a formação de um halo bem amarelado (devido aos carotenóides) e translúcido. A LDL foi cuidadosamente recolhida e dialisada contra o tampão Tris-HCl 20mM, pH 7.4 no escuro a 4°C por 2 horas com trocas sucessivas do tampão a cada meia hora. Após a diálise, a LDL foi filtrada em filtro com poro de 0,22µm.

3.1.2. Separação da LDL nativa e LDL (-) da LDL total por cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC)

A cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC) tem como objetivo separar as subfrações de LDL após ultracentrifugação seqüencial. Uma vez que, tanto a subfração não modificada (LDL nativa) quanto a modificada [LDL (-)] permanecem na mesma fração de LDL total obtida após a ultracentrifugação seqüencial. A metodologia baseia-se em um gradiente salino (NaCl) como descrito a seguir.

O isolamento da LDL nativa e LDL (-) foi realizado por cromatografia líquida em FPLC com o auxílio de uma coluna UNO Q12 (BioRad). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 mL do tampão B (Tris-HCl 20mM, NaCl 1M, pH 7.4) e depois equilibrada com 300 mL de tampão A (Tris-HCl 20mM, pH 7.4). Após a lavagem da coluna, 5mL da LDL previamente dialisada e filtrada foi injetada na coluna. O procedimento cromatográfico foi estabelecido em um fluxo de 4 mL/min em diferentes gradientes: 0 a 100 mL: 0% tampão B; 100 a 200 mL gradiente contínuo: 0 a 10 % tampão B; 200 a 400 mL: 22% tampão B; 400 a 600 mL: 50% tampão B; 600 a 800 mL: 100% tampão B (Figura 1) .

As subfrações purificadas de LDL foram dialisadas contra o tampão PBS 1x (NaCl 1.4 M, KCl 26 mM, KH₂PO₄ 14 mM, NaHPO₄ 12H₂O 80 mM) pH 7.4 no escuro a 4°C por 2 horas com trocas sucessivas do tampão a cada meia hora. Logo após, estas foram tratadas com 25 µg/mL de polimixina B à 37°C por 45 minutos para a remoção

de Lipopolissacarideo (LPS). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et. al., 1951).

Figura 1: Cromatograma referente à purificação de LDL nativa e LDL(-) por FPLC. A LDL nativa (primeiro pico) tem um tempo de retenção entre 28.11 a 30.61 minutos após o início da corrida cromatográfica em um gradiente salino de 20 a 50%. A LDL (-) (segundo pico) tem tempo de retenção entre 37.33 a 38.03 minutos após o início da corrida em um gradiente salino de 50 a 100%. O terceiro pico não apresenta interesse neste estudo, pois refere-se a uma subfração mais modificada do que a LDL (-), denominada LDL(2-), com tempo de retenção entre 44.85 a 45.49 minutos após o início da corrida em um gradiente salino de 100%.

3.1.3. Eletroforese de lipoproteínas

Para a certificação de que as partículas de interesse estão realmente purificadas, uma eletroforese em gel de agarose foi realizada. A eletroforese foi feita com a aplicação de 0,5 μ L, em poços distintos, de plasma (marcador), LDL nativa e LDL (-) em gel de agarose utilizando o kit comercial da Celm (CELMGEL) com o tampão Tris-HCL 58 mM, pH 9.5 a 100 volts. O tempo de corrida eletroforética foi de 14 minutos. Todas as amostras foram aplicadas no pólo negativo para posterior migração das partículas em direção ao pólo positivo.

Para identificar a purificação, a amostra de LDL nativa deverá migrar menos do que a de LDL (-), pois esta apresenta mais carga negativa do que a LDL nativa, migrando mais para o pólo positivo (Figura 2).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose para lipoproteínas. Como podemos ver, a LDL nativa aplicada nos poços 3 e 8 migrou menos do que a LDL (-) aplicada nos poços 5 e 6. Nos poços 1 e 10 aplicou-se o soro como referência e nos poços 4 e 7 aplicou-se a amostra da subfração mais modificada, LDL(2-).

3.2. Ensaios para a avaliação da citotoxicidade da LDL (-)

3.2.1. Cultura de células

As células endoteliais linhagem HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) foram cultivadas com meio RPMI 1640 suplementado com NaHCO_3 25 mM, hepes 20 mM, 25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

3.2.2. Viabilidade celular

Após o cultivo de células endoteliais da linhagem HUVEC conforme descrito acima, as células foram plaqueadas em placas de 6 wells na densidade de 3×10^5 por well. Após aderências das células na placa, cerca de 3 horas, o meio foi aspirado e substituído por meio de cultura com 1% de soro fetal bovino. As células foram mantidas nestas condições por 24 horas. Após este período, o meio foi novamente aspirado e substituído por meio com as partículas de interesse, LDL nativa e LDL(-), na ausência de soro. Ambas as partículas foram testadas nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Após o tempo de incubação estabelecido (24 horas), as células foram removidas da placa com PBS/EDTA, pH 7,4 e tripsina. As células coletas em tubos falcon de 15 ml, foram centrifugadas a 2.200 rpm por 2 minutos e ressuspensas em meio de cultura em um volume suficiente para contar de 10 a 100 células por quadrante de uma câmara de Neubauer. Uma alíquota de células em meio de cultura foi misturada na proporção de 1:1 com tripan blue. As células não viáveis são tingidas com o reagente apresentando a coloração azul.

3.2.3. Morte celular

As mesmas células, ressuspensas em meio de cultura para a contagem em câmara de Neubauer com tripan blue, foram centrifugadas a 2.200 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em etanol 70% para

permeabilização da membrana das células viáveis, durante 2 horas à 37°C, ou, até 20 dias à -20°C.

Em seguida, as células foram tratadas com uma solução de iodeto de propídio (PI) por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Para a solução de PI utilizou-se: 20 µL de ribonuclease (RNase) (20 mg/mL), 50 µL de PI (50 µg/mL) e 5 µL de triton X-100 em q. s. p. 5 mL de PBS 1x.

Após o tratamento das células com a solução, estas foram lavadas uma vez com PBS 1x e ressuspensas em PBS 1x. As células em suspensão foram transferidas para tubos FACS e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur na densidade de 10.000 células (eventos) por amostra. O conteúdo de DNA foi analisado pelo canal de fluorescência 3 (FL3) em escala logarítmica para a avaliação da morte celular. A porcentagem de células em morte foi determinada com o auxílio do programa de computador Cell Quest.

3.3. Ensaios para a avaliação do efeito da LDL (-) na angiogênese *in vitro*

Os ensaios *in vitro* são designados para mimetizar cada um dos múltiplos eventos que constituem o processo de angiogênese (Taraboletti & Giavazzi, 2004).

Os ensaios *in vitro* que são prontamente quantificáveis incluem ensaios de degradação da matriz extracelular (zimografia), ensaios de proliferação (ciclo celular) e migração celular (cicatrização *in vitro*) e ensaios de quimiotaxia e formação de túbulos (anéis de aorta). Cada um destes ensaios reflete um evento particular envolvendo células endoteliais durante sua resposta a estímulos angiogênicos (Auerbach et. al., 2000).

3.3.1. Zimografia

Após o cultivo das células endotélias da linhagem HUVEC como descrito no item 3.2.1, estas foram plaqueadas em placas de 6 wells na densidade de 5×10^5 por well. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi descartado e substituído por meio com as partículas de interesse, LDL nativa e LDL (-), na ausência de soro. Ambas as partículas foram testadas nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL, em triplicata. Após o tempo de incubação estabelecido (72 horas), o meio de cultura foi

coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Preparou-se um gel de acrilamida 10% contendo 0,1% de gelatina. Para 10 mL de gel foi utilizado: 4 mL de água deionizada; 3,30 mL de acrilamida/bis 30%; 2,5 mL de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; 100 µL de gelatina 100X (10% de gelatina em água deionizada); 100 µL de SDS 10%; 100 µL de APS 10% e 5 µL de TEMED. A mistura foi homogeneizada com cuidado para não formar bolhas. A cuba de eletroforese foi montada, o gel aplicado e a polimerização aguardada.

Preparou-se o gel de stacking 5% utilizando: 5,68 mL de água deionizada; 1,67 mL de acrilamida/bis 30%; 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8; 100 µL de SDS 10%; 50 µL de APS 10% e 5 µL de TEMED. A mistura foi homogeneizada com cuidado para não formar bolhas e adicionada sobre o gel de corrida e, então, o pente foi colocado.

As amostras (25 µg/ml) foram diluídas 1:1 com tampão de amostra (2% de SDS, Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e colocadas em banho maria a 55 °C, por 3 a 5 minutos.

As amostras foram carregadas no gel e submetidas a eletroforese em um sistema SDS-PAGE a 100 volts por 90 minutos. A cuba foi mantida em gelo ou na geladeira. Utilizou-se tampão de corrida Tris-glicina-SDS (Tris-Base 25 mM, glicina 250 mM e 0,1% de SDS, pH 8.3).

Após a eletroforese, o gel de stacking foi descartado e o gel de corrida foi transferido para um recipiente contendo uma solução de Triton X-100 2,5%, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Procederam-se duas lavagens de 15 minutos cada sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de Triton foi descartada e o gel incubado em uma solução tampão reveladora (Tris 50 mM, pH 8.8; CaCl₂ 10 mM, NaCl 0,15 M) por 40 horas a 37 °C.

Após a incubação em solução reveladora, fixou-se o gel em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético, 40% de água) por 15 minutos sob agitação e a temperatura ambiente. A solução descorante foi descartada e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham) por 2 a 3 horas. Em seguida, descartou-se o corante e o gel foi aplicado em solução descorante.

A atividade das metaloproteinases foi identificada como bandas claras de lise em fundo azul. Estas bandas foram analisadas com auxílio de um densitômetro

(BioRad) e quantificadas pelo programa de computador Molecular Analyst. A MMP-2 apresenta os pesos moleculares de 72 e 62 kDa e a MMP-9 92 e 88 kDa, para o zimogênio e a forma ativa, respectivamente.

3.3.2. Ensaio de cicatrização

Após o cultivo das células endotéliais da linhagem HUVEC como descrito no item 3.2.1, estas foram plaqueadas em placas de 24 wells na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por well. Ao atingir 100% de confluência as células formaram uma monocamada. Após a formação da monocamada, cerca de 24 horas, o meio foi aspirado e substituído por meio de cultura com 1% de soro fetal bovino. As células foram mantidas nestas condições por 24 horas. Então, abriu-se uma fenda no sentido vertical no centro da monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 1mL, deixando este espaço livre de células, mimetizando uma ferida. O meio foi aspirado e a fenda foi lavada uma vez com PBS 1x, para retirar as células removidas. Após a lavagem, o meio de cultura foi repostado, porém com as partículas de interesse, LDL nativa e LDL (-), na ausência de soro. Ambas as partículas foram testadas nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, em quadriplicata. Após este procedimento, utilizando um microscópio invertido acoplado com uma câmera, fotos da fenda no tempo zero foram tiradas com o auxílio do programa de computador Axio Vision. O tratamento foi mantido por 24 horas. Após as 24 horas, da mesma maneira, fotos da fenda foram tiradas. Em poder das imagens, a área da fenda foi mensurada com auxílio do programa de computador Image J. Para encontrar a área de células que migraram, subtraiu-se o valor da área da fenda em 24 horas do valor da área da fenda em tempo zero.

3.3.3. Ciclo celular

Um método alternativo para avaliar a proliferação é pela análise do ciclo celular, utilizando citometria de fluxo (Gomez & Reich, 2003).

Após o cultivo de células endoteliais da linhagem HUVEC conforme descrito no item 3.2.1, as células foram plaqueadas em placas de 6 wells na densidade de 3×10^5 por well. Após aderências das células na placa, cerca de 3 horas, o meio foi aspirado e substituído por meio de cultura com 1% de soro fetal bovino. As células

foram mantidas nestas condições por 24 horas. Após este período, o meio foi novamente aspirado e substituído por meio com as partículas de interesse, LDL nativa e LDL(-), na ausência de soro. Ambas as partículas foram testadas nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL, em triplicata. Após o tempo de incubação estabelecido (24 horas), as células foram removidas da placa com PBS/EDTA, pH 7,4 e tripsina.

Após a remoção das células da placa, estas foram centrifugadas a 2.200 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em etanol 70% para permeabilização da membrana das células viáveis, durante 2 horas à 37°C, ou, até 20 dias à -20°C.

Em seguida, as células foram tratadas com uma solução de iodeto de propídeo (PI) por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Para a solução de PI utilizou-se: 20 µL de ribonuclease (RNase) (20 mg/mL), 50 µL de PI (50 µg/mL) e 5 µL de triton X-100 em q. s. p. 5 mL de PBS 1x.

Após o tratamento das células com a solução, estas foram lavadas uma vez com PBS 1x e ressuspensas em PBS 1x. As células em suspensão foram transferidas para tubos FACS e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur na densidade de 10.000 células (eventos) por amostra. O conteúdo de DNA foi analisado pelo canal de fluorescência 2 (FL2) em escala linear para a avaliação do ciclo celular. A população a ser analisada foi selecionada em histograma bivariado da área FL2 (FL2A) versus a largura de FL2 (FL2-W), que permite excluir agregados de duas ou mais células que poderiam superestimar a fração de células em S/G2/M. As porcentagens de células nas fases G0/G1, S/G2/M foram determinadas com o auxílio do programa de computador Cell Quest.

Para avaliação da proliferação celular foi feita uma relação entre os valores médios de células nas fases G0/G1 e S/G2/M, conforme a fórmula descrita a seguir:

$$R = \frac{x \pm \Delta x}{y \pm \Delta y} = \frac{x}{y} \pm \frac{x \cdot \Delta y + y \cdot \Delta x}{y^2}$$

Onde:

X = equivale à média dos valores referentes às fases G0/G1;

Y = equivale à média dos valores referentes às fases S/G2/M;

Δx = equivale ao desvio padrão dos valores referentes às fases G0/G1;

Δy = equivale ao desvio padrão dos valores referentes às fases S/G2/M.

3.3.4. Anéis de aorta

Ratos machos da raça Wister com 8 a 12 semanas foram sacrificados por deslocamento das vértebras cervicais. Após o sacrifício, removeu-se a aorta torácica rapidamente, colocando-a imediatamente em PBS 1x gelado. A aorta foi lavada gentilmente com meio de cultura MCDB 131(Gibco) gelado, usando uma seringa de 1mL com uma agulha de calibre 23 até que esta estivesse livre de coágulos de sangue. Cuidadosamente, os vasos colaterais e o tecido fibroadiposo foram removidos com o auxílio de uma fina tesoura de microdissecção. Utilizando um bisturi a aorta foi cortada em anéis com 1mm de comprimento.

Em um fluxo laminar, os anéis foram transferidos para um tubo falcon estéril com 10mL de meio de cultura MCDB 131(Gibco) gelado. Esperou-se que os anéis sedimentassem, o meio foi descartado e substituído por meio novo. Este processo foi repetido por cinco vezes. Os anéis foram então despejados em uma placa de petri com meio de cultura MCDB 131(Gibco) e mantidos em gelo.

Enquanto isso, ainda no fluxo laminar, preparou-se a solução de colágeno, misturando no gelo, 7.5 volumes de colágeno tipo I (2mg/mL) com 1 volume de MEM 10x, 1.5 volumes de NaHCO_3 1,4% e 0.1 volume de NaOH 1M. A mistura foi homogeneizada com cuidado para não formar bolhas.

Em uma placa de 48 wells, adicionou-se 200 μL da solução de colágeno por well para forrar a superfície de cada well. A placa de cultura foi mantida em estufa, sob constante umidade para evitar a desidratação, até a solidificação da solução de colágeno. Com o auxílio de uma pinça, os anéis foram colocados gentilmente em uma placa de petri limpa para a remoção do excesso de meio e distribuídos na placa de cultura com a superfície de cada well forrada com a solução de colágeno, de maneira que o lúmen estivesse orientado horizontalmente. Com cuidado, cada well foi preenchido com 200 μL da solução de colágeno para cobrir cada anel de aorta.

Para cada well foi adicionado 1mL de meio de cultura MCDB 131(Gibco), suplementado com glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e NaHCO_3 25 mM. Neste meio também foi adicionado as partículas de interesse, LDL nativa e LDL (-). Ambas as subfrações foram testadas nas concentrações de 0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$. Os anéis de aorta foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por seis dias.

No sexto dia, utilizando um microscópio invertido acoplado com uma câmera, o crescimento de túbulos foi avaliado e o comprimento dos mesmos foi medido com o auxílio do programa de computador Axio Vision.

3.3.5. *Protein array*

Após o cultivo das células endotéliais da linhagem HUVEC como descrito no item 3.2.1, estas foram plaqueadas em P 100 na densidade de 2×10^6 por placa. As células confluíram por 24 horas. Após este período, as mesmas foram tratadas com 32 $\mu\text{g/mL}$ de LDL nativa e LDL (-), na ausência de soro, durante 24 horas. O meio de cultura foi coletado e acondicionado a 4°C.

Duas membranas contendo diferentes anticorpos para a detecção de fatores pró- e anti-angiogênicos, RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I e II (RayBiotech), foram incubadas com 2mL de tampão de bloqueio 1x (RayBiotech), em temperatura ambiente por 30 minutos. Este tampão foi removido e as membranas foram incubadas com 1,2 mL do meio de cultura anteriormente reservado, em temperatura ambiente por 2 horas.

Após este período, as membranas foram lavadas por 3 vezes com 2 mL de tampão de lavagem I 1x (RayBiotech), em temperatura ambiente sob agitação durante 5 minutos por lavagem. As membranas foram lavadas por mais 2 vezes com 2 mL de tampão de lavagem II 1x (RayBiotech), em temperatura ambiente sob agitação durante 5 minutos cada lavagem. Adicionou-se às membranas 1 mL de uma solução de anticorpos biotina-conjugados (RayBiotech) a 4°C *overnight*.

As membranas foram novamente lavadas como descrito no parágrafo anterior e incubadas com 2 mL de uma solução de conjugado estreptavidina - *Horseradish peroxidase* (HRP) (RayBiotech) por 2 horas a temperatura ambiente. Lavou-se as membranas novamente como descrito no parágrafo anterior.

Para a detecção utilizou-se 500 μL do tampão de detecção C 1x (RayBiotech) e 500 μL do tampão de detecção D 1x (RayBiotech), os tampões foram misturados. Removeu-se o excesso de tampão de lavagem das membranas e estas foram colocadas em uma lamina plástica limpa (encontrada no kit), do lado contrário em que se encontram as proteínas a serem detectadas. Transferiu-se a mistura de

tampões de detecção sobre as membranas, sendo estas incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos.

O excesso do reagente de detecção foi removido e delicadamente colocou-se nas membranas, do lado em que se encontram as proteínas, outra lamina de plástico. Gentilmente, removeu-se qualquer bolha de ar encontrada entre as laminas de plástico e as membranas, evitando usar pressão sobre as membranas.

As membranas foram expostas por 50 segundos a um filme de raio-x (Kodak) e o sinal foi detectado usando revelador de filme.

A intensidade do sinal foi avaliada com auxílio de um densitômetro (BioRad) e quantificada pelo programa de computador Molecular Analyst.

3.4. Ensaio para a avaliação do efeito da LDL (-) na angiogênese *in vivo*

Os ensaios *in vitro* não podem ser considerados conclusivos, pois estes ensaios freqüentemente não traduzem os efeitos da angiogênese *in vivo*, devido à sua natureza complexa (Auerbach et. al., 2000). No entanto, um teste crítico da angiogênese requer uma avaliação mais integrada e muitos ensaios *in vivo* têm sido desenvolvidos para permitir uma avaliação mais adequada da resposta angiogênica (Auerbach et. al., 2003).

O ensaio da membrana corioalantóica de galinha (CAM) é provavelmente o ensaio *in vivo* mais utilizado para o estudo da angiogênese (Ribatti & Vacca, 1999).

3.4.1. Membrana corioalantóica de galinha (CAM)

Ovos brancos de galinha embrionados da linhagem Leghorn foram colocados em incubadora por 3 dias sob constante umidade a 37°C. No terceiro dia, em um fluxo laminar, uma janela foi aberta na casca de cada ovo após a remoção de 3 mL de albumina para descolar a membrana corioalantóica (CAM) da casca. A janela foi selada com uma fita adesiva.

Os ovos foram mantidos por mais 5 dias na incubadora. No oitavo dia, no fluxo laminar, os ovos foram novamente abertos para tratamento da CAM com as partículas de interesse, LDL nativa e LDL (-).

Para isso, pedaços de papel filtro foram cortados com furador de papel e autoclavados. Os mesmos foram tratados com hidrocortisona (2,5 mg/mL) para prevenir reações inflamatórias na CAM.

Os pedaços de papel filtro foram imersos em Ringer's (NaCl 0,15 M, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM) com 0 e 32 µg/mL de LDL nativa e LDL (-). Os mesmos foram colocados sobre a CAM em uma região vascularizada. O tratamento foi mantido por 72 horas, com reaplicações a cada 24 horas.

Após as 72 horas, a região da CAM com o papel filtro foi fixada com formaldeído 10%. Os ovos foram deixados na geladeira por 20 minutos. Contudo, a região da CAM com o papel filtro foi recortada e colocada em formaldeído 10%. Utilizando uma lupa acoplada com uma câmera, fotos desta região foram tiradas com o auxílio do programa de computador Act2U da Nikon.

Nas fotos, selecionou-se um vaso qualquer. Com o auxílio do programa de computador Image J o comprimento do vaso foi medido e suas ramificações contadas.

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da citotoxicidade da LDL (-) para células endoteliais

Muitas linhas de evidências demonstram que a LDL oxidada desempenha um importante papel na patogênese da aterosclerose (Chen et. al., 2004). Contudo, a existência no sangue de significantes quantias de uma forma modificada de LDL com propriedades aterogênicas é objeto de controvérsias. Nos últimos anos, uma subfração eletronegativa de LDL vem sendo isolada do plasma humano. Tem-se sugerido que a LDL eletronegativa, LDL (-), é resultado de processos peroxidativos, devido maior conteúdo de lipoperoxidos e óxidos de colesterol e menor conteúdo de α -tocoferol do que a LDL nativa. No entanto, a natureza oxidativa da LDL (-) tem sido questionada por estudos que não encontraram marcadores de oxidação lipídica nesta partícula. Controvérsias também existem relacionadas com a afinidade da LDL (-) com o receptor de LDL. Descobertas indicam menor, similar ou maior afinidade da LDL (-) ao receptor de LDL. Contudo, a grande maioria dos estudos concordam que tanto a LDL oxidada quanto a LDL (-) são citotóxicas para células endoteliais, sugerindo que a LDL (-) pode afetar a função de células endoteliais e ser aterogênica (De Castellarnau et. al., 2000).

Tai et. al. (2006) observaram que como a LDL oxidada, a LDL (-) inibiu a viabilidade celular e induziu a condensação de cromossomos ou a fragmentação de DNA, um efeito que foi muito menor para a LDL nativa.

Resultado semelhante foi visualizado por Xavier (2003) que verificou que tanto a LDL oxidada quanto a LDL (-) apresentaram efeito citotóxico para células endoteliais.

No entanto, um estudo realizado por Boullier et. al. (2006) demonstrou que a LDL (-) quando incubada concomitantemente com a LDL oxidada diminui a morte celular induzida pela LDL oxidada.

Em contraste, alguns estudos demonstram nenhum efeito citotóxico atribuído a LDL oxidada (Huang et. al, 2001; Zettler et. al., 2003). Da mesma maneira, no presente estudo não observamos efeito citotóxico da LDL (-) em células endoteliais.

Avaliamos a morte celular por citometria de fluxo, mensurando a porcentagem de células endoteliais hipodiplóides e a viabilidade celular pela capacidade das células endoteliais de incorporarem ou não um reagente de coloração azul, o Tripan

Blue. Observamos que após 24 horas de tratamento nem a viabilidade celular nem a morte celular foram afetadas pela LDL (-).

Ao considerarmos um nível de confiança global de 5%, observamos que tanto para a morte celular quanto para a viabilidade celular, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL (-), para quaisquer comparações entre concentrações (Figura 3).

Figura 3: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na morte e viabilidade de células endoteliais. (A) Histograma do canal de fluorescência FL-3 em escala logarítmica de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (0,2,4,8,16 e 32 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas com PI. A região M1 refere-se às células hipodiplóides (mortas). **(B)** Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) na morte e **(C)** viabilidade de células endoteliais após 24 horas de tratamento. Com um nível descritivo de 0,397 e 0,832 respectivamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL (-) para quaisquer comparações entre concentrações.

4.2. Efeitos da LDL (-) na angiogênese *in vitro*

A formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, ou angiogênese, é uma seqüência de eventos de grande importância em processos fisiológicos e patológicos que incluem a degradação da matriz extracelular, migração e proliferação de células endoteliais dentro de um novo espaço, maturação, diferenciação e aderência das células endoteliais umas as outras e a formação de túbulos (Griffioen & Molema, 2000; Rundhaug, 2003). A LDL (-) pode prejudicar cada um destes processos, desregulando a função endotelial (Tai et. al., 2006).

4.2.1. Degradação da matriz extracelular

A formação de novos vasos requer tanto a degradação da membrana basal rica em laminina que envolve as células endoteliais quanto a proteólise da matriz extracelular rica em colágeno do tecido conectivo circundante. A degradação da matriz pode facilitar a angiogênese por ativar proteínas angiogênicas ou liberar fatores de crescimento vinculados a matriz. Este processo pode liberar também fragmentos anti-angiogênicos da matriz, como a angiostatina e a endostatina (Griffioen & Molema, 2000).

A degradação da matriz extracelular é realizada por um arsenal proteolítico principalmente composto de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e seus receptores (u-PAR), metaloproteinases (MMPs) e metaloproteinases tipo membrana (MT1-MMPs). Estas proteases são inibidas por inibidores do ativador de plasminogênio (PAIs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A degradação da matriz é resultante do desequilíbrio entre estes ativadores e inibidores (Muñoz-Chápuli et. al., 2004).

Estas proteases além de participarem do remodelamento tecidual associado com o desenvolvimento também participam da patogênese de doenças, tais com a aterosclerose (Visse & Nagase, 2003). Sabe-se que a degradação localizada da matriz extracelular desempenha um papel de grande importância na patogênese da aterosclerose, incluindo a migração precoce de monócitos para a parede da artéria (Galis et. al., 1995; Shah et. al., 1999).

Além disso, tem-se reportado que a LDL oxidada modula a expressão destas proteases e seus inibidores teciduais em diferentes tipos de células e, conseqüentemente na placa aterosclerótica (Uzui et. al., 2002).

Huang et. al. (2001) mostraram que a LDL oxidada estimula a atividade de collagenase endotelial por regular reciprocamente a expressão de MMP-1 e TIMP-1, sugerindo que a LDL oxidada pode facilitar a neovascularização na placa aterosclerótica. Ao mensurarem a atividade de collagenase em meio condicionado de células endoteliais incubadas com LDL oxidada, para confirmar que a LDL oxidada pode promover o aumento da atividade de collagenase contribuída por sua habilidade de estimular MMP-1 e inibir TIMP-1, viram que a atividade de collagenase foi significante maior do que aquela observada no meio condicionado de células controle.

Um estudo realizado por Shah et. al. (1999) mostrou que a LDL oxidada desempenha de forma semelhante um ação recíproca em macrófagos, estimulando MMP-9 enquanto inibe TIMP-1.

De acordo com estes estudos, Virgili et. al. (1999) mostraram que em células endoteliais a LDL oxidada foi capaz de aumentar a expressão de MMP-2 e MMP-9, indicando que a LDL oxidada induz a degradação da matriz aumentando a vulnerabilidade da placa aterosclerótica.

No entanto, em estudo realizado por Tai et. al. (2006) a atividade de MMP-2 e MMP-9 foi inibida pela LDL oxidada. Resultado semelhante foi visto em células endoteliais tratadas com a LDL (-). Ambas reduziram a atividade destas MMPs por aproximadamente 40% do controle, enquanto que a LDL nativa não apresentou efeito. Esta observação foi confirmada por Western blot, revelando que os níveis de MMP-2 e MMP-9 estavam diminuídos em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL oxidada e LDL (-), mas não em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa. No entanto, ao avaliar os níveis de MMP-2 e MMP-9 na própria célula, estas subfrações não apresentaram efeito. Estes dados indicam que a LDL oxidada e LDL (-) podem afetar a secreção destas MMPs pelas células endoteliais.

Além disso, a LDL oxidada também mostrou estimular PAI-1 enquanto inibiu o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) em células endoteliais, assim favorecendo a coagulação e promovendo eventos coronários agudos (Maruyama, 1998).

Em estudo realizado por De Castellarnau et. al. (2000) verificou-se que em meio de cultura de células endoteliais tratadas, tanto com LDL oxidada quanto com LDL (-), os níveis de PAI-1 estavam aumentados em comparação com o meio de cultura de células endoteliais não tratadas. No entanto, o mesmo efeito foi visto para as células endoteliais tratadas com LDL nativa.

No presente trabalho, avaliamos o efeito da LDL nativa e LDL (-) na atividade de MMP-2, MMP-9 e seus zimógenos precursores em meio de cultura de células endoteliais por zimografia.

Ao considerarmos um nível de confiança global de 5%, observamos que não houve diferença entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL (-), para quaisquer comparações entre concentrações na atividade das MMPs. Além disso, não foi possível visualizar a atividade de MMP-9, apenas de seu zimógeno precursor, pró-MMP-9 (Figura 4).

No entanto, ao avaliarmos a presença da MMP-1 e MMP-9 em meio de cultura das mesmas células por *protein array*, vimos que a LDL (-) em relação a LDL nativa reduziu a secreção de MMP-1 ($p < 0.05$) e inibiu por completo a secreção de MMP-9 (Figura 5). Concomitantemente, a LDL (-) aumentou a secreção de TIMP-1 e TIMP-2 por estas células (Figura 6).

TIMP-1 e -3 são anti-angiogênicas, enquanto TIMP-2 pode auxiliar no processo de angiogênese (Westermarck & Kähäri, 1999). TIMP-2 está envolvida na ativação do zimógeno precursor de MMP-2, a pró-MMP-2. No entanto, apesar da LDL (-) ter aumentado a secreção de TIMP-2 esta não foi capaz de aumentar a atividade de MMP-2. Contudo, devemos considerar que a ativação da pró-MMP-2 depende da atividade cooperativa de outra MMP, a MT1-MMP. Nesta situação, o balanço entre MT1-MMP e TIMP-2 é importante. Em concentrações baixas, TIMP-2 liga-se ao sítio catalítico de alguma das moléculas de MT1-MMP ativada que gera um receptor para pró-MMP-2, assim promovendo sua ativação para MMP-2. Por outro lado, se em altas concentrações, TIMP-2 liga-se e inativa qualquer atividade de MT1-MMP, conseqüentemente prevenindo a ativação de pró-MMP-2 (Yoon et. al., 2003). Para que a secreção aumentada de TIMP-2 por células endoteliais tratadas com LDL (-) pudesse auxiliar na ativação da pró-MMP-2, a secreção de MT1-MMP não poderia ter sido afetada. Contudo, a secreção de MT1-MMP por células endoteliais tratadas com LDL (-) não foi avaliada.

Estudos anteriores mostraram que TGF- β 1 diminui a expressão de MMP-1 e aumenta a expressão de TIMP-1 (Overall et. al., 1991).

Vimos também que a LDL (-) foi capaz de estimular a secreção de TGF- β 1 (Figura 13), podendo explicar seu efeito na redução da secreção de MMP-1 e aumento da secreção de TIMP-1.

Além disso, MMPs e TIMPs podem regular a secreção e atividade de citocinas inflamatórias. As MMPs -1 e -9 tem a habilidade de processar precursores de algumas citocinas, como IL-1 β e TNF- α , dando origem as suas formas ativas (Visse & Nagase, 2003; Yoon et. al., 2003). A secreção destas citocinas foi inibida por células endoteliais tratadas com LDL (-) (Figura 14), coincidindo com seus efeitos na secreção de MMPs. Estas citocinas pró-inflamatórias não apenas estão presentes nas lesões ateroscleróticas, mas também estão envolvidas no processo de angiogênese. TNF- α pode afetar a proliferação de células endoteliais *in vitro*, enquanto a IL-1 β está envolvida na regulação de VEGF *in vivo* (Liekens et. al., 2001).

Avaliamos também a expressão do u-PAR em meio de cultura de células endoteliais por *protein array* e vimos que a LDL (-) não produziu efeito sob a expressão desta proteína quando comparada com a LDL nativa (Figura 5).

Com estes dados, sugerimos que a LDL (-) pode afetar a secreção de MMPs e aumentar a secreção de seus inibidores endógenos por células endoteliais, inibindo a degradação da matriz e interrompendo a angiogênese.

Figura 4: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na atividade de MMPs e seus zimógenos precursores. (A) Zimografia em gel de agarose. Atividade de MMPs e seus zimógenos precursores em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (0,2,4,8,16 e 32 μg/mL). (B) Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) na atividade de pró-MMP-9. (C) pró-MMP-2 e (D) MMP-2 em meio de cultura de células endoteliais após 72 horas de tratamento. Com um nível descritivo de 0,888, 0,409 e 0,747 respectivamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL (-) para quaisquer comparações entre concentrações.

A

POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	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	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
uPAR	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

B

C

Figura 5: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de MMP-1, MMP-9 e u-PAR por células endoteliais. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech). (B) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). (C) O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos, tornando possível a comparação. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$) na secreção de MMP-1.

A

POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

B

LDL nativa

LDL (-)

C

Figura 6: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de TIMP-1 e TIMP-2 por células endoteliais. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech). (B) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). (C) O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos, tornando possível a comparação. A LDL (-) estimulou a secreção de ambas as TIMPs em relação a LDL nativa.

4.2.2. Migração celular

A migração de células endoteliais é um evento inicial crítico para a formação de novos vasos e para o reparo de injúrias vasculares (Tai et. al., 2006).

Estudo realizado por Xavier (2004) demonstrou que a LDL oxidada tem a capacidade de inibir a migração de células endoteliais *in vitro*. Efeito também visualizado por Van Aalst et. al. (2004) que demonstraram que a inibição na migração de células endoteliais tratadas com LDL oxidada poderia ser atenuada por antioxidantes.

Contudo, resultado semelhante foi visto por células endoteliais tratadas com LDL (-). Estudo realizado por Tai et. al. (2006) confirmou que como a LDL oxidada, a LDL (-), reduziu a migração de células endoteliais. Este resultado sugere que a LDL (-) pode prejudicar a cicatrização em resposta a injúria endotelial (Tai et. al., 2006).

Sendo a degradação da matriz extracelular essencial para a motilidade celular o mecanismo pelo qual a LDL (-) atenua a migração celular pode ser atribuído a sua propriedade de inibir a secreção de proteases que degradam moléculas da matriz extracelular (Tai et. al., 2006).

No entanto, no presente trabalho observamos que a LDL (-) foi capaz de estimular a migração de células endoteliais. Contudo, devemos levar em consideração que no ensaio utilizado neste estudo a migração celular não foi dependente da degradação da matriz extracelular.

Para avaliar a migração celular utilizamos um ensaio de cicatrização com células endoteliais. Após 24 horas de tratamento, a LDL (-) estimulou a migração de células endoteliais em todas as concentrações testadas quando comparada ao tratamento controle ($p < 0.001$). Em relação às células endoteliais tratadas com LDL nativa, a LDL (-) estimulou a migração nas concentrações de 2 ($p < 0.001$), 8 ($p < 0.05$) e 16 ($p < 0.05$) $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

Contudo, acreditamos que este efeito deva-se ao efeito da LDL (-) na indução da secreção de fatores envolvidos na migração celular, tais como, VEGF, VEGF-D, PDGF-BB e TPO enquanto que a LDL nativa inibiu a secreção destes fatores (ver item 4.2.5.1). Além disso, células endoteliais tratadas com LDL (-) secretaram menos endostatina (ver item 4.2.5.3).

A

B

Figura 7: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na migração de células endoteliais. (A) Imagens de fendas realizadas em monocamadas de células endoteliais e tratadas com LDL nativa e LDL (-) (0,2,4,8,16 e 32 µg/mL). A região demarcada refere-se a região livre de células (fenda). Quanto menor a fenda melhor o processo de migração celular. **(B)** Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) na migração de células endoteliais após 24 horas de tratamento. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos controle e LDL nativa (+ $p < 0.05$), controle e LDL (-) (* $P < 0.05$), LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$).

4.2.3. Proliferação celular

Os pré-requisitos necessários para iniciar a resposta proliferativa são a sinalização celular, promovida por hormônios e fatores peptídicos de crescimento, a transdução do sinal extracelular, a partir de receptores específicos e de proteínas intracelulares e a ativação da expressão de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (Pardee, 1989).

O ciclo celular divide-se tradicionalmente em interfase e mitose. A fase de divisão, denominada mitose ou fase M, é separada da divisão seguinte pela interfase. A observação de que a duplicação (replicação) dos cromossomos ocorre durante um período específico da interfase originou a sua divisão em três partes, tendo o período de síntese do DNA sido denominado fase S, a fase que o antecede G1 e o período entre a fase S e a mitose seguinte, G2 (Sherr, 2002).

A mitose é uma fase relativamente curta do ciclo celular sendo a sua duração bastante constante entre diferentes tipos de células. O mesmo acontece relativamente às fases S e G2, verificando-se que, em termos de duração, a maior variabilidade ocorre na fase G1. Esta fase corresponde ao período em que a célula cresce e executa as suas funções e verifica-se que, com raras exceções, as células que pararam de se dividir, quer temporária quer definitivamente, seja no organismo seja em cultura, fazem-no em um ponto imediatamente anterior à iniciação da síntese de DNA. As células nestas condições dizem-se em G0, distinguindo assim as células que abandonaram o ciclo celular daquelas que se encontram numa fase G1 típica (Darnell et. al., 1997).

A fase G0 é o período de tempo indeterminado em que a célula pode ficar em estado de quiescência, não havendo divisão celular nem duplicação do DNA (Pardee, 1989).

A re-entrada de células em G0 no ciclo celular, passando a G1, dá-se por resposta a estímulos externos (ex. Fatores de crescimento) (Darnell et. al., 1997).

A passagem da fase G1 para a fase S consiste na fosforilação de Rb pelos complexos formados entre ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e a ativação do fator geral de transcrição E2F. O controle da expressão e da degradação de diferentes ciclinas e da atividade de suas CDKs correspondentes ocorre ao longo de todas as fases do ciclo celular. A partir da fosforilação de Rb e da liberação de E2F, há um comprometimento com a progressão do ciclo celular,

concomitante com o início da síntese de DNA (fase S). Este processo marca um ponto no ciclo celular, denominado *start*, que constitui um ponto sem retorno. A partir do momento em que é desencadeado, o ciclo celular não pode "voltar atrás" (Rebustini, 2003; Darnell et. al., 1997). Após a síntese de DNA a célula inicia a preparação da mitose, correspondente a fase G2. Nessa etapa ocorre a ativação da proteína p53 responsável por detectar erros de replicação (mutação do DNA) e material genético não duplicado (Rebustini, 2003).

A mitose (ou fase M) consiste na divisão celular propriamente dita, caracterizada pela condensação e segregação de cromossomos e pela desorganização da estrutura da membrana nuclear. Após a segregação de cromossomos, a membrana nuclear é novamente organizada e ocorre a divisão do material citoplasmático (Rebustini, 2003).

Sabemos que a LDL oxidada desempenha um papel crítico na aterosclerose, em parte por estimular a proliferação de células dentro da parede do vaso. *In vitro*, a LDL (-) é capaz de evocar uma resposta proliferativa em uma variedade de tipos celulares, incluindo células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (Zettler et. al., 2003).

Segundo Zettler et. al. (2003), a LDL oxidada induziu um aumento significativo do número total de células musculares lisas e fibroblastos em cultura na ausência de qualquer outra citocina ou fator de crescimento. Portanto, este estudo identifica a LDL oxidada como um componente capaz de induzir a proliferação na ausência de qualquer outro fator mitogênico. A ação mitogênica da LDL oxidada foi similar a do FGF-2. Mas a mais importante e surpreendente observação foi que a LDL oxidada estimulou a simultânea indução de ativadores e supressores do ciclo celular. Esta indução generalizada de todas as proteínas do ciclo celular contribui para uma resposta proliferativa controlada consistente com o crescimento celular não maligno típico de uma placa aterosclerótica (Zettler et. al., 2003).

No entanto, Seibold et. al. (2004) observaram que a LDL oxidada, dependendo de sua concentração, influencia a regulação do ciclo celular por induzir a proliferação celular tanto quanto a apoptose e necrose em células endoteliais. Eles viram que a LDL oxidada (1 a 10 µg/mL) causou uma forte resposta proliferativa em células endoteliais, enquanto que altas concentrações (20 a 50 µg/mL) resultaram na diminuição ou inibição da resposta proliferativa. Concluindo que baixas concentrações de LDL oxidada induz a proliferação de células endoteliais, enquanto

altas concentrações induz a hipertrofia (ocorre quando as células estão na fase G1) de células endoteliais (Seibold et. al., 2004).

Por outro lado, um outro estudo desenvolvido por Zettler et. al. (2004) revelou que a LDL oxidada, mesmo em baixas concentrações (10 $\mu\text{g/mL}$), surpreendentemente inibiu a proliferação de células musculares lisas e fibroblastos por inibir a translocação nuclear de proteínas do ciclo celular.

Coincidentemente, a LDL (-) apresentou efeito citotóxico e anti-proliferativo mesmo em baixas concentrações (2 a 8 $\mu\text{g/mL}$) em cultura de células endoteliais da artéria coronária humana (Xavier, 2003).

Adicionalmente, Chen et. al. (2003) observaram que a LDL (-) induziu a apoptose em cultura de células endoteliais por inibir a transcrição de um importante fator mitogênico, o FGF-2, conseqüentemente podendo afetar a proliferação celular.

Em nosso trabalho não vimos efeito da LDL (-) no ciclo celular de células endoteliais quando comparada ao controle. No entanto, em comparação com a LDL nativa (16 $\mu\text{g/mL}$) vimos que a porcentagem de células em G0/G1 foi maior ($P<0.01$) (Figura 8 B).

Mesmo assim, com um nível descritivo de 0,065, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL(-) para quaisquer comparações entre concentrações na porcentagem de células em ciclo (S/G2/M). Indicando que a diminuição na porcentagem de células em G0/G1 para células endoteliais tratadas com LDL nativa (16 $\mu\text{g/mL}$) não deve-se a entrada destas células em ciclo (Figura 8 C).

Contudo, a LDL nativa (16 $\mu\text{g/mL}$) em comparação com o tratamento controle inibiu a proliferação celular ($p<0.05$), enquanto que a LDL (-) não demonstrou efeito (Figura 9).

Para elucidarmos melhor o efeito atribuído à LDL nativa teríamos que avaliar a atividade de proteínas envolvidas no ciclo celular.

No entanto, este resultado pode estar atribuído ao efeito da LDL nativa na inibição de fatores importantes para a proliferação celular tais como, FGF-2, VEGF, VEGF-D, PDGF-BB e EGF (ver item 4.2.5.1). Além disso, a LDL nativa estimulou a secreção de endostatina por células endoteliais (ver item 4.2.5.3).

A

B

C

Figura 8: Efeito da LDL nativa e LDL (-) no ciclo celular de células endoteliais. (A) Histograma do canal de fluorescência FL-2 em escala linear de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL (-) (0,2,4,8,16 e 32 µg/mL) e incubadas com PI. A região M2 refere-se às células em G0/G1 e a região M3 equivale às células em S/G2/M. **(B)** Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) na porcentagem de células endoteliais em G0/G1 e **(C)** S/G2/M após 24 horas de tratamento. **(B)** Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos controle e LDL nativa (+ $p < 0.05$), LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$). **(C)** Com um nível descritivo de 0,065, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tratamentos controle, LDL nativa e LDL(-) para quaisquer comparações entre concentrações na porcentagem de células em ciclo (S/G2/M).

Figura 9: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na proliferação de células endoteliais. A proliferação está representada pela relação entre os valores médios de células nas fases G0/G1 e S/G2/M. Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) (0,2,4,8,16 e 32 µg/mL) na proliferação de células endoteliais. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos controle e LDL nativa (+ $p < 0.05$).

4.2.4. Formação de túbulos

Após a proliferação e migração, as células endoteliais estão abeis para recuperar a quiescência, produzir uma nova laminina basal, recrutar células perivasculares e formar túbulos com lúmen (Muñoz-Chápuli et. al., 2004).

Tai et. al. (2006) investigaram o efeito da LDL (-) na formação de túbulos por células endoteliais em uma matriz extracelular e observaram que a LDL oxidada e LDL (-) afetaram profundamente a formação de vasos enquanto que a LDL nativa não apresentou nenhum efeito.

Resultado semelhante foi observado por Xavier (2003), onde a LDL (-) promoveu a diminuição no número de túbulos neoformados.

Igualmente, no presente estudo, observamos que LDL (-) (4 e 8 $\mu\text{g/mL}$) afetou a formação de túbulos por células endoteliais em uma matriz de colágeno ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente) quando comparada com o tratamento controle. Contudo, efeito semelhante foi visto para a LDL nativa (4 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, em relação ao tratamento controle o efeito da LDL (-) foi mais persistente que o efeito da LDL nativa. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos LDL nativa e LDL (-) (Figura 10).

Sabemos que a LDL nativa no presente trabalho não afetou a secreção de proteases essenciais para a degradação da matriz extracelular. Contudo, afetou diretamente a migração celular, além de reduzir a proliferação celular. Resultados que podem ter prejudicado a formação de túbulos.

No entanto, apesar da LDL (-) ter aumentado a migração celular, esta partícula inibiu a secreção de proteases essenciais para a degradação da matriz. Além da degradação da matriz ser etapa indisponível para a migração celular, esta pode reforçar o mecanismo de inibição da apoptose por evitar o risco de anoikis. Por esta razão, sinais que induzem a migração celular podem também promover a sobrevivência celular. Não surpreende que a inibição da degradação da matriz extracelular previne a invasão e ativa a apoptose no endotélio (Muñoz-Chápuli et. al., 2004).

Este resultado revelou que a LDL (-) afetou a interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular, sugerindo que a LDL (-) pode ter propriedade anti-angiogênica *in vivo* (Tai et. al., 2006).

Figura 10: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na formação de túbulos por células endoteliais em uma matriz de colágeno. Anéis de aorta envoltos em uma solução de colágeno tipo I foram tratados com LDL nativa e LDL (-) (0,2,4 e 8 $\mu\text{g/mL}$) por seis dias. Efeito de concentrações variáveis de LDL nativa e LDL (-) no comprimento total de túbulos formados. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos controle e LDL nativa (+ $p < 0.05$), controle e LDL (-) (* $P < 0.05$).

4.2.5. Secreção de fatores pró- e anti- angiogênicos por células endoteliais

Moléculas angiogênicas específicas podem iniciar o processo de angiogênese, assim como, moléculas inibitórias específicas podem parar o processo (Folkman & Shing, 1992). A expressão desequilibrada de fatores pró - e anti - angiogênicos e seus receptores na célula endotelial determinará a geração e regressão de novos vasos sanguíneos (Bian et. al., 2004).

4.2.5.1. Fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos

VEGF é reconhecido como um potente fator angiogênico que promove a migração de macrófagos, evento crítico para a aterosclerose. Além disso, VEGF estimula a degradação da matriz extracelular, migração, proliferação e formação de túbulos de células endoteliais. A transcrição do RNAm de VEGF é induzido por diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β e IL-1 β . VEGF pode assim funcionar como um mediador de fatores angiogênicos que atuam indiretamente (Liekens et. al., 2001).

Recentes evidências indicam que a LDL oxidada estimula a secreção de VEGF e a expressão de seu RNAm em células endoteliais e macrófagos (Ramos et. al., 1998; Inoue et. al., 2001). Tai et. al. (2006) verificaram o mesmo efeito para a LDL (-), que aumentou a expressão de VEGF em células endoteliais.

De acordo com estes estudos, vimos que a LDL (-) estimulou a secreção de VEGF por células endoteliais (Figura 11).

No entanto, a completa resposta biológica de VEGF depende de sua interação com VEGFR-2. A dimerização do VEGFR-2 conduz ao aumento da permeabilidade, proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais (Griffioen & Molema, 2000).

Contudo, vimos que não foi possível detectar a presença VEGFR-2 em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL (-) (Figura 12). No entanto, células endoteliais tratadas com LDL nativa não foram capazes de secretar VEGF, tornando impossível a dimerização deste receptor e sua conseqüente resposta biológica (Figura 11).

Outros membros da família VEGF, como VEGF-D e PLGF também tiveram sua secreção estimulada em células endoteliais tratadas com LDL (-) (Figura 11).

VEGF-D pode ligar-se e ativar o VEGFR-2. Desde que VEGFR-2 é o principal transdutor dos efeitos pró-angiogênicos de VEGF, não surpreende que VEGF-D possa induzir a angiogênese. No entanto, diferente de VEGF, VEGF-D liga-se ao VEGFR-3. VEGFR-3 é usualmente expresso por células endoteliais de vasos linfáticos, mas não de vasos sanguíneos. A interação de VEGFR-3 com VEGF-D é suficiente para induzir a linfangiogênese (Neufeld & Kessler, 2006).

PLGF foi identificado como uma citocina pertencente à família VEGF devido sua homologia e conservação de características estruturais. Em contraste com VEGF, PLGF liga-se a VEGFR-1, mas não a VEGFR-2 e VEGFR-3. PIGF aumenta a vascularidade tumoral e promove a sobrevivência de células endoteliais (Neufeld & Kessler, 2006).

Outro receptor conhecido como Tie 2 também é bastante citado por desempenhar efeitos na angiogênese. Tie 2 é membro da família de receptores tirosina - quinases e é quase que exclusivamente expresso em células endoteliais (Muñoz-Chápuli et. al., 2004). Os ligantes para Tie-2 são: angiopoietina 1 (Ang-1) e angiopoietina 2 (Ang-2). Ambos ligam-se ao Tie-2, mas apenas a Ang-1 resulta na transdução de sinais e regulação da angiogênese (Suri et. al., 1996). A Ang-1 em células endoteliais induz a migração e tem efeito anti-apoptótico, porém não induz a proliferação celular. Além disso, a Ang-1 promove a formação de túbulos por células endoteliais *in vitro* e sinergicamente com VEGF aumenta a angiogênese *in vitro* (Neufeld & Kessler, 2006).

Contudo, como a Ang-2 compete com Ang-1 pelo mesmo receptor está é considerada um antagonista natural para Ang-1, inibindo a angiogênese (Maisonpierre et. al., 1997).

A Ang-2 induz o recrutamento de células murais para novos vasos sanguíneos, prevenindo a sua estabilização. No entanto, na presença de VEGF, a angiogênese continua independente da presença de Ang-2, sendo até aumentada pela Ang-2. Porém, na ausência de VEGF a formação de novos vasos sanguíneos regride como resultado do efeito destabilizante da Ang-2. Tem-se demonstrado que em camundongos com deficiência de Ang-2 o desenvolvimento vascular ocorre normalmente. Contudo, estes camundongos apresentam prejuízo no desenvolvimento de vasos linfáticos indicando que Ang-2 desempenha um papel na linfangiogênese (Neufeld & Kessler, 2006).

Neste caso, em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL (-) não foi possível visualizar a expressão das angiopoietinas e seu receptor Tie 2. No entanto, em meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa visualizamos a expressão de ambas angiopoietinas e seu receptor Tie 2. Contudo, a secreção de Ang-2 foi nove vezes maior que a secreção de Ang-1 (Figura 12).

Segundo Chen et. al. (2003), a LDL (-) é capaz de induzir apoptose em cultura de células endoteliais por inibição da transcrição do FGF-2, fator importante também na angiogênese. Contudo, no presente trabalho, a LDL (-) induziu a secreção de FGF-2 por células endoteliais (Figura 11).

FGF-2 é um potente indutor da proliferação de células endoteliais e desempenha uma potente atividade em ensaios de angiogênese *in vivo*. FGF-2 também desempenha um papel morfogenético e estimula a formação de túbulos em cultura de células endoteliais (Neufeld & Kessler, 2006).

A LDL (-) também estimula a secreção de PDGF-B, que desempenha um papel central na modulação do crescimento e migração de células musculares lisas e nas propriedades angiogênicas de células endoteliais (De Castellarnau et. al., 2007). Há quatro polipeptídios PDGF conhecidos – PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D – estes podem formar homodímeros e heterodímeros em condições fisiológicas. PDGF-BB, um polipeptídio homodimérico que desempenha um papel chave na angiogênese é expresso por muitas células, incluindo células endoteliais e uma variedade de células tumorais (Mc Carty et. al., 2007).

No presente trabalho, foi possível verificar que a LDL (-) estimulou a secreção de PDGF-BB por células endoteliais (Figura 11). PDGF-BB pode apresentar efeito autocrino direto em células que expressam PDGF-R β , tais como pericitos, levando ao aumento da proliferação e migração. Ademais, a produção de PDGF-BB por células cancerosas do cólon resulta em indução da angiogênese por aumentar a proliferação de células endoteliais. Recentes dados mostram que uma das funções de PDGF-BB é aumentar a expressão de VEGF em células musculares lisas vasculares (Mc Carty et. al., 2007).

Outros fatores de crescimento que tiveram sua secreção aumentada por células endoteliais tratadas pela LDL (-) foram EGF e IGF (Figura 11).

O Fator de crescimento epidérmico (EGF) liga-se ao receptor EGFR. A ativação da via de sinalização por EGFR em células cancerosas está ligada com o aumento da proliferação celular, angiogênese e metástase tão bem quanto com a

diminuição da apoptose. EGF é mitogênico para células endoteliais e tem demonstrado promover a angiogênese *in vivo*. O bloqueio deste receptor resulta na diminuição da densidade vascular e aumento da apoptose de células endoteliais (Distler et. al., 2003).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são fatores de promoção do crescimento com estrutura molecular homóloga à da insulina, encontrados na forma de IGF-1 e IGF-2. Estes fatores são sintetizados pelo fígado e pela maioria das células orgânicas, em resposta à ativação promovida pelo hormônio de crescimento (GH) ou de forma independente. Os IGFs podem influenciar o crescimento, diferenciação e metabolismo celulares (Gomes et. al., 2003). Além disso, estimulam a síntese de VEGF e u-PA em linhagem celulares de câncer de mama (Distler et. al., 2003).

A angiogenina e a trombopoietina foram outros fatores angiogênicos que tiveram suas secreções estimuladas por células endoteliais tratadas com LDL (-) (Figura 11).

A angiogenina pode influenciar a adesão de células endoteliais por sua habilidade de ligar-se a componentes da matriz extracelular. Esta também tem a habilidade de induzir a angiogênese em modelos *in vivo*. No entanto, a angiogenina não influencia a migração e proliferação de células endoteliais *in vitro* (Distler et. al., 2003).

Trombopoietina (TPO) é um hormônio constitutivamente produzido pelo fígado e rins, sendo o principal regulador da produção de plaquetas (Wendling, 1999). TPO é responsável por múltiplos efeitos incluindo mudanças na função celular, diferenciação e formação de túbulo epitelial, além de estimular a motilidade celular endotelial e a angiogênese *in vivo* e *in vitro* (Brizzi et. al., 2007).

A

POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

B

LDL nativa

LDL (-)

C

Figura 11: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de fatores de crescimento e outros fatores envolvidos na angiogênese. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech). **(B)** RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). **(C)** O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos tornando possível a comparação. A LDL (-) estimulou a secreção de todos os fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos avaliados nesta membrana em relação a LDL nativa.

A

POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	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	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
uPAR	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

B

C

Figura 12: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de Ang-1, Ang-2, Tie-2 e receptores para VEGF (VEGFR-2 e -3) por células endoteliais. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech). **(B)** RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). **(C)** O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos tornando possível a comparação. A LDL (-) inibiu a secreção de todos os fatores e receptores angiogênicos avaliados nesta membrana em relação a LDL nativa.

4.2.5.2. Citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune

A LDL oxidada é um importante auto-antígeno envolvido na aterosclerose e tanto a LDL oxidada quanto anticorpos anti-LDL oxidada estão presentes na lesão aterosclerótica. Complexos imunes de LDL oxidada e anticorpos anti-LDL oxidada podem ser ingeridos por macrófagos, levando a sua ativação e subsequente liberação de citocinas inflamatórias (Tedgui & Mallat, 2006).

As citocinas são agrupadas em muitas classes: Fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN), fatores estimuladores de colônia (CSF), Fatores transformadores do crescimento (TGF), quimiocinas e interleucinas (IL). Estas são especialmente importantes para regular a resposta inflamatória e imune e tem função crucial no controle da imunidade inata e adaptativa (Tedgui & Mallat, 2006).

Lipídeos e/ou fosfolipídios oxidados que estão contidos na LDL oxidada e LDL (-) são capazes de induzir a produção de $\text{TNF-}\alpha$ por monócitos, a secreção de $\text{IFN-}\gamma$ por linfócitos e a produção de $\text{IL-1}\beta$ em macrófagos, além de induzirem a liberação de IL-6 , IL-8 e MCP-1 por células endoteliais (Tedgui & Mallat, 2006).

Em nosso trabalho vimos que LDL (-) foi capaz de estimular a secreção de $\text{TGF-}\beta$ (Figura 13), enquanto a LDL nativa induziu a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ por células endoteliais (Figura 14). Citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{TGF-}\beta$ são abundantemente expressas nas placas ateroscleróticas (Libby, 2002; Nikol et. al., 1992).

$\text{TNF-}\alpha$ é uma citocina pró-inflamatória que pode ser secretada por monócitos, astrócitos, fibroblastos e células musculares lisas. Na angiogênese, $\text{TNF-}\alpha$ apresenta efeito similar a $\text{TGF-}\beta$. Ambos em baixas doses promovem a proliferação de células endoteliais e a formação de túbulos *in vitro*, enquanto que em altas concentrações tem efeito inibitório. Similar a $\text{TGF-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ induz a formação de novos vasos *in vivo* através de sua propriedade pró-inflamatória. No entanto, a atividade de $\text{TNF-}\alpha$ é significativamente inibida por $\text{IFN-}\gamma$ (Distler et. al., 2003).

$\text{IFN-}\gamma$ foi a primeira citocina identificada por mostrar efeito em células endoteliais. Na aterosclerose, $\text{IFN-}\gamma$ inibe a proliferação de células musculares lisas e a produção de colágeno, promovendo a instabilidade da placa (Mantovani et. al., 1998). Na angiogênese, $\text{IFN-}\gamma$ inibe a proliferação celular induzida por FGF-1 . Esta inibição está associada com a redução da ligação de FGF-1 para a superfície de

células endoteliais, indicando que o mecanismo de inibição pode ser via modulação do receptor de FGF. Estudos demonstram que IFN- γ inibe o crescimento celular endotelial induzido por IL-2. Além disso, IFN- γ inibe a formação de tubos *in vitro* (Klagsbrun & D'Amore, 1991). A LDL (-) estimulou a secreção de IFN- γ por células endoteliais (Figura 13).

Em contraste ao estudo realizado por De Castellarnau et. al. (2007) que verificou que a LDL (-) estimulou a secreção de GM-CSF por células endoteliais, vimos que em relação a LDL nativa a LDL (-) reduziu a secreção de GM-CSF ($p < 0.05$) (Figura 13). GM-CSF são fatores de crescimento mielóides requeridos para a sobrevivência, crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas (Klagsbrun & D'Amore, 1991). Além disso, GM-CSF promove a migração e proliferação de células endoteliais (Distler et. al., 2003). Acreditamos que este efeito deva-se ao aumento da secreção de IL-1 e TNF- α por células endoteliais tratadas com LDL nativa, já que estas citocinas aumentam a produção de M-CSF, GM-CSF e G-CSF por células musculares lisas, células endoteliais e monócitos (Figura 14).

Assim como Benítez et. al. (2007) vimos que a LDL (-) aumentou em relação a LDL nativa a secreção de diferentes moléculas inflamatórias, incluindo GRO ($p < 0.01$), IL-6 ($p < 0.01$) e IL-8 ($p < 0.05$) e estimulou a secreção de MCP-1 e ENA-78 por células endoteliais, confirmando seu efeito pró-inflamatório (Figura 13).

Em nosso estudo, vimos também, que a LDL (-) foi capaz de inibir a secreção de algumas citocinas por células endoteliais, tais como IL-4, IL-2, IL-1 β , IL-1 α , MCP-3 e I-TAC e diminuir a secreção de MCP-4 ($p < 0.05$) e I-309 ($p < 0.01$) em relação a LDL nativa (Figura 14). Adicionalmente, vimos que a LDL (-) estimulou a secreção de RANTES em comparação com a LDL nativa (Figura 13).

O repertório de quimiocinas encontrado em células endoteliais inclui membros da família de quimiocinas CXC (IL-8, ENA-48, GRO e I-TAC) e CC (MCP-1, MCP-3, MCP-4, I-309, RANTES) (Mantovani et. al., 1998).

Estruturalmente a família de quimiocinas CXC é caracterizada por quatro resíduos do aminoácido cisteína conservados próximos ao domínio amino-terminal. Os dois primeiro resíduos de cisteína são separados por um aminoácido não conservado, assim formando o motivo Cys-X-Cys ou CXC. Esta família é subdividida em quimiocinas que apresentam ou não outra seqüência de três aminoácidos, ácido

glutâmico-leucina-arginina, o chamado motivo ELR, proximal a sequência CXC (Mehrad et. al., 2007). Os membros do subgrupo que apresentam o motivo ELR (ELR+), GRO α , β e γ , IL-8 e ENA-78, induzem a migração e proliferação de células endoteliais *in vitro* por ativarem o receptor CXCR2 (Distler et. al., 2003; Muñoz-Chápuli et. al., 2004). Em contraste, quimiocinas deste subgrupo que não apresentam o motivo ELR (ELR-), como I-TAC, são inibidores da angiogênese. Estes atuam não apenas como antagonistas de quimiocinas ELR+, mas também como inibidores do efeito angiogênico de fatores de crescimento, tais como VEGFs e FGFs (Distler et. al., 2003).

O receptor CXCR3B media a atividade angiostática de I-TAC em células endoteliais microvasculares humanas. A ativação de CXCR3 também pode inibir a angiogênese relacionada ao tumor (Mehrad et. al., 2007).

Enquanto, grande parte da literatura sobre a regulação da angiogênese por quimiocinas está focada no papel da família CXC, muitos membros da família de quimiocinas CC estão envolvidos na angiogênese. Na família CXC um aminoácido separa os dois primeiros resíduos de cisteína, enquanto na família CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. O membro mais estudado da família de quimiocinas CC implicado na angiogênese é MCP-1. MCP-1 liga-se ao receptor CCR2. Este receptor é expresso em células endoteliais e sua ativação demonstra induzir a quimiotaxia e formação de túbulos *in vitro*. *In vivo*, MCP-1 media a angiogênese em CAM e em modelos de implantes subcutâneos e em córnea, indicando a importante função de MCP-1 na angiogênese (Mehrad et. al., 2007).

Berkhout et. al. (1997) descreveram e caracterizaram uma nova quimiocina da família CC, MCP-4. A expressão de MCP-4 foi demonstrada por imunohistoquímica em lesões ateroscleróticas humanas. Estudos em monócitos mostraram que MCP-4 interage com o receptor de MCP-1 (CCR2), concluindo que MCP-4, como MCP-1, pode estar envolvida no recrutamento de monócitos para a parede da artéria durante a aterosclerose (Apostolakis et. al., 2006). Além de MCP-4 induzir a angiogênese via receptor CCR2, esta quimiocina também está envolvida com a ativação de pró-MMP-9 (Coussens et. al., 1999). Outra quimiocina da família CC que pode exercer função pró-aterogênica e pró-angiogênica via receptor CCR2 é MCP-3 (Borish & Steinke, 2003).

Haque et. al. (2000) demonstrou que I-309, uma quimiocina da família CC produzida por células endoteliais estimula a proliferação e migração de células

musculares lisas, indicando que esta quimiocina tem um importante papel na aterosclerose. Bernardini et. al. (2000) demonstraram que I-309 em células endoteliais induz a quimiotaxia, invasão e diferenciação. I-309 tem atividade angiogênica *in vivo*, indicando que esta molécula pode ser um modulador da angiogênese (Bernardini et. al., 2000).

RANTES é uma quimiocina da família CC que serve como um quimioatraente para uma variedade de células e é produzida por linfócitos T ativados, monócitos, células epiteliais e fibroblastos (Kim et. al., 2003). RANTES foi detectado em linfócitos, macrófagos, miofibroblastos e células endoteliais de artérias com aterosclerose acelerada, concluindo que RANTES pode ser um mediador da infiltração celular vista em lesões ateroscleróticas (Apostolakis et. al., 2006). Um estudo subsequente realizado por Adler et. al. (2003) sugere que a expressão de MMP-9 pode ser regulada por RANTES. Portanto, RANTES pode desempenhar um papel na angiogênese (Adler et. al., 2003).

A família IL-1 compreende dois agonistas, IL-1 α e IL-1 β . Ambas ligam-se a mesmo receptor e induzem uma resposta similar, mas enquanto IL-1 β é secretada de células produtoras, IL-1 α é usualmente encontrada como uma proteína ligada à membrana celular (Neufeld & Kessler, 2006). Estudos indicam claramente que a IL-1 contribui para a aterosclerose em camundongos. Este conhecimento é provido por experimentos mostrando que a deficiência de IL-1 em camundongos knockout para apoE dificulta o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Tedgui & Mallat, 2006). IL-1 induz a angiogênese indiretamente através da ativação da expressão de VEGF em células musculares lisas. Porém, este não é o único mecanismo atribuído a IL-1, pois IL-1 β induz a expressão de Ang-1. Contudo, não se sabe se IL-1 pode induzir a angiogênese pela ativação direta de células endoteliais (Neufeld & Kessler, 2006).

IL-2 é conhecida como um fator de crescimento para células T e também como um potente imuno modulador. Sua principal função é a ativação de várias células do sistema imune incluindo células T helper, células B, células natural killer (NK) e macrófagos (Tayal & Kalra, 2007). IL-2 vem sendo usada com relativo sucesso em tratamentos para melanoma e carcinoma renal. Para pacientes com carcinoma renal, o tratamento com IL-2 aumentou a média de sobrevivência para 5 a 10 anos após o tratamento. Para pacientes com melanoma o tumor não progrediu por 5 a 15 anos (Salazar-Onfray et. al., 2007). É conhecido que durante a

administração da IL-2 a ativação de uma complexa rede de citocinas está em progresso, mas poucos dados estão disponíveis sobre o efeito desta ativação na angiogênese (Simonelli et. al., 2006). Portanto, Simonelli et. al. (2006) avaliaram o efeito da administração de IL-2 na ativação de fatores angiogênicos tais como, VEGF, MMP-2 e MMP-9. Esta observação demonstrou que IL-2 não afeta a liberação destes fatores angiogênicos. Em contraste, observaram um significativo aumento dos níveis de IFN- γ , TNF- α e ICAM (Simonelli et. al., 2006). Na aterosclerose, a ausência de informações sobre o efeito de IL-2 na composição da lesão aterosclerótica impede conclusões do papel definitivo de IL-2 (Tedgui & Mallat, 2006).

A IL-4, uma citocina pleiotrópica e crucial moduladora do sistema imune, tem sido implicada na neovascularização. No entanto, seu papel e mecanismo específicos permanecem desconhecidos. IL-4 demonstrou ter efeito inibitório em etapas críticas da angiogênese *in vitro*, efeito suportado por estudos *in vivo* que demonstraram que tumores expressando IL-4 têm a vascularidade reduzida. Similarmente, foi demonstrado que IL-4 bloqueia a neovascularização na córnea de ratos mediada por FGF-2 (Volpert et. al., 1998). Em contraste, outros trabalhos demonstram que IL-4 pode induzir a angiogênese *in vitro* e *in vivo* (Fukushi et. al., 1998). Os efeitos de IL-4 são geralmente considerados como anti-inflamatórios. No entanto, evidências indicam que IL-4 pode desempenhar um papel na aterosclerose por indução de respostas inflamatórias, tais como o aumento da expressão de VCAM-1 e MCP-1 (Tedgui & Mallat, 2006).

A IL-6 tem demonstrado aumentar o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, sugerindo que IL-6 é uma citocina pró-aterogênica (Tedgui & Mallat, 2006). A IL-6 está associada com a indução da angiogênese durante o desenvolvimento de folículos ovarianos e durante a formação de rede capilar na camada decídua do útero para implantação embrionária. A IL-6 pode regular a síntese de VEGF e, portanto sua atividade angiogênica pode ser de forma indireta (Neufeld & Kessler, 2006).

A leptina que compartilha similaridade estrutural e funcional com IL-6 aumenta a produção de TNF α , IL-6 e IL-12 de monócitos estimulados por LPS além de desempenhar um importante papel na regulação da imunidade adaptativa (Tedgui & Mallat, 2006). A leptina foi uma das primeiras adipocinas identificadas. Trata-se de um peptídeo liberado pelo tecido adiposo que regula o apetite, a massa corporal e a

termogênese por suas ações ao nível do hipotálamo (Bahia et. al., 2006). Os receptores de leptina também são expressos no endotélio. Este peptídeo exerce diversos efeitos neste sítio, incluindo ativação do sistema nervoso simpático, estimulação da angiogênese, aumento da agregação plaquetária e produção de superóxido (Sierra-Honigmann et. al., 1998). Em que extensão estes efeitos são inter-relacionados e envolvidos na patogênese da disfunção endotelial permanece para ser esclarecido. Em pacientes com doença coronariana estabelecida, os níveis de leptina foram preditores de eventos isquêmicos futuros (Wolk et. al., 2004), e em um estudo caso-controle com indivíduos portadores de hipercolesterolemia a leptina foi fator de risco para eventos cardiovasculares, mesmo após ajuste para todos os outros fatores de risco (Wallace et. al., 2001). A LDL (-) foi capaz de induzir a secreção de leptina por células endoteliais (Figura 13).

PECAM é membro da superfamília de imunoglobulinas. PECAM-1 é expressa em plaquetas, leucócitos e células endoteliais nas junções intercelulares, onde está localizada em grande quantidade. Tem-se sugerido que PECAM-1 auxilia na migração de leucócitos para o local da inflamação, na ativação de células T, na agregação plaquetária e angiogênese. A interação célula a célula mediada pela PECAM-1 é necessária para a organização de células endoteliais em uma estrutura tubular *in vitro* (Distler et. al., 2003). A LDL (-) inibiu a secreção desta molécula por células endoteliais (Figura 14).

A

POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenina	EGF	ENA-78	FGF-2
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptina	MCP-1	PDGF-BB
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
PLGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGF-D
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

B

C

Figura 13: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech). **(B)** RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). **(C)** O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos tornando possível a comparação. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$) na secreção de GRO, IL-6 e IL-8.

A

POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	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	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
uPAR	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

B

C

Figura 14: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de citocinas e outras moléculas envolvidas no sistema imune. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech). (B) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). (C) O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos tornando possível a comparação. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$) na secreção de GM-CSF, MCP-4 e I-309.

4.2.5.3. Fragmentos de proteínas resultantes da proteólise da matriz extracelular

Avaliamos a secreção por células endoteliais tratadas com LDL (-) dos inibidores endógenos da angiogênese resultantes da proteólise da matriz extracelular, a angiostatina e a endostatina. Observamos que a LDL (-) apenas demonstrou efeito sob a secreção de endostatina. Em relação a LDL nativa, a LDL(-) inibiu a expressão de endostatina por células endoteliais ($p < 0,05$) (Figura 15).

A endostatina foi primeiramente identificada em meio condicionado de uma linhagem celular de hemangioendotelioma como um potente inibidor da angiogênese e crescimento tumoral *in vivo*. A endostatina também bloqueia a migração e proliferação de células endoteliais e aumenta a apoptose. Além disso, a endostatina reduz a angiogênese induzida por FGF-2 e VEGF e diminui a expressão de VEGF em células tumorais. Tem-se sugerido que a interação de endostatina com tropomiosina resulta na interrupção da integridade de microfilamentos e pode, contudo contribuir para o efeito angiostático da endostatina por inibir a motilidade celular. Evidência adicional para o efeito angiostático da endostatina foi provida por experimentos em que camundongos com feridas profundas na pele foram tratados sistematicamente com endostatina. Neste modelo, a densidade vascular não foi afetada e não houve nenhuma anormalidade macroscópica na cicatrização. No entanto, a análise ultra-estrutural revelou severa anormalidade nos novos vasos formados, com vasos estreitos ou completamente fechados com uma superfície luminal irregular e com a parede do vaso desintegrada (Distler et. al., 2003).

A

POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
POS	POS	NEG	NEG	Ang-1	Ang-2	Angiostatina	Endostatina
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	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	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
uPAR	VEGFR-2	VEGFR-3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

B

C

Figura 15: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na secreção de Angiostatina e Endostatina por células endoteliais. (A) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech). (B) RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array II (RayBiotech) após 2 horas de tratamento com meio de cultura de células endoteliais tratadas com LDL nativa e LDL(-) (32 μ g/mL). (C) O controle positivo (POS) foi utilizado para normalizar o resultado de membranas com diferentes tratamentos tornando possível a comparação. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos LDL nativa e LDL (-) (# $p < 0.05$) na secreção de Endostatina.

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

4.3. Efeitos da LDL (-) na angiogênese *in vivo*

4.3.1. Membrana corioalantóica de galinha (CAM)

Não são muitos os estudos que avaliam o efeito da LDL (-) na angiogênese *in vivo*. A maioria destes avaliam os efeitos da LDL (-) em ensaios da angiogênese *in vitro*. Estes mesmos trabalhos apenas sugerem um efeito anti-angiogênico da LDL(-) na angiogênese *in vivo* baseados nos resultados visualizados *in vitro*.

Contudo, apesar dos efeitos que vimos *in vitro*, com um nível descritivo de 0,906, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos três tratamentos (controle, LDL nativa e LDL(-)).

A

B

Figura 16: Efeito da LDL nativa e LDL (-) na angiogênese *in vivo*. (A) Imagens da região da membrana corioalantóica delimitada com papel filtro e tratada com LDL nativa e LDL (-) (32 μ g/mL). (B) Com um nível descritivo de 0,906, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos três tratamentos (controle, LDL nativa e LDL(-)).

5.0. COSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo observamos que a LDL (-) foi capaz de afetar o equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos, estimulando a secreção de fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos em relação a LDL nativa (Figura 11). Resultado que explica o efeito da LDL (-) no aumento da migração celular (Figura 7), apesar de seu efeito na inibição da expressão de receptores essenciais para a resposta angiogênica de VEGF e membros de sua família (Figura 12).

No entanto, a formação de túbulos foi afetada pela LDL (-) *in vitro* (Figura 10), resultado que indica que o efeito inibitório da LDL (-) na secreção de MMPs (Figura 5) e, hipoteticamente, conseqüente inibição da degradação da matriz, foi fator limitante para a formação de túbulos.

Contudo, tanto quanto a LDL (-), a LDL nativa foi capaz de estimular a secreção de citocinas que podem estar envolvidas na modulação da angiogênese (Figura 13 e 14). Mesmo assim, foi apenas possível observar efeito da LDL nativa na secreção de MMPs (Figura 5), porém este efeito não foi determinante para a formação de túbulos (Figura 10). Afinal a LDL nativa inibiu a migração celular (Figura 7), efeito que pode estar relacionado não apenas com o seu efeito na inibição da secreção de fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos (Figura 11), mas também com o aumento da secreção de endostatina por células endoteliais (Figura 15), que alias afetaram também a proliferação celular (Figura 9).

Segundo Tai et. al. (2006) o efeito da LDL (-) na inibição da formação de túbulos (Figura 10) está relacionada com o prejuízo na interação entre células endoteliais e matriz extracelular, indicando que esta partícula pode ter propriedade anti-angiogênica *in vivo*. No entanto, não observamos efeito de nenhuma das partículas na angiogênese *in vivo* (Figura 16).

6.0. CONCLUSÕES

- Não houve efeito citotóxico atribuído a LDL (-) para células endoteliais;
- A LDL (-) inibiu a secreção de MMPs, concomitantemente com o aumento da secreção de TIMPs, podendo ter um papel na inibição da degradação da matriz extracelular;
- Células endoteliais tratadas com LDL (-) migraram mais do que células endoteliais sem tratamento ou tratadas com LDL nativa;
- A LDL (-) não afetou a proliferação de células endoteliais;
- A formação de túbulos *in vitro* foi prejudicada pela LDL (-), sugerindo que a LDL (-) afetou a interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular, propondo um efeito anti-angiogênico *in vivo*;
- A LDL (-) estimulou a secreção de fatores de crescimento e outros fatores angiogênicos por células endoteliais;
- A LDL (-) estimulou a secreção de citocinas pró-inflamatórias que podem modular a angiogênese direta ou indiretamente;
- Contudo, não foi possível reconhecer efeito da LDL (-) na angiogênese *in vivo*.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**Ofício CEP nº 103/2005

São Paulo, 02 de agosto de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).**Laila Abicais Sangaletti****Orientador: Prof. Dulcinéia Saes Parra Abdalla****FBC**

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 1º de agosto de 2005, **APROVOU** o projeto "Estudo dos mecanismos de morte celular e da modulação da angiogênese induzida pela LDL eletronegativa." (Protocolo CEP nº 307) apresentado por Vossa Senhoria.

Informamos que este projeto será encaminhado à CONEP, por solicitação via SISNEP (Sistema Nacional de Ética em Pesquisa), sendo necessário aguardar o parecer favorável daquele órgão para iniciá-lo.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 48/2006

São Paulo, 24 de abril de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).

Laila Abicais Sangaletti

Orientador(a) Prof. (a) Dulcinéia Saes Parra Abdalla

FBC

Vimos encaminhar o Parecer nº 305/2006 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, referente as considerações sobre o seu projeto "Estudo dos mecanismos de morte celular e da modulação da angiogênese induzida pela LDL eletronegativa." (Protocolo CEP nº 307).

Salientamos que, conforme os comentários finais da CONEP no presente parecer, de acordo com a Res. CNS 196/96, manifestaram-se pela **aprovação** do projeto de pesquisa proposto.

Sendo o que nos cumpre, apresentamos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP