

Fernanda Portella Sampaio

**Influência do background
genético na angiogênese
inflamatória sob a influência do
dipiridamol**

Universidade Federal de Minas Gerais
2012

Fernanda Portella Sampaio

Influência do background genético na angiogênese inflamatória sob a influência do dipiridamol

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Fisiologia
Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Passos Andrade

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2012

**Este trabalho foi desenvolvido no
laboratório de angiogênese do
departamento de fisiologia e biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais**

Agradecimentos

Findos dois anos e após tanto trabalho a quem devo agradecer? Acredito que a todos que estiveram comigo e me aguentaram lamentando as dificuldades ou que se alegraram com as pequenas e grandes vitórias diárias ou até mesmo secaram minhas lágrimas e inculiram esperança com frases de apoio do tipo: “Não se preocupe..tudo vai dar certo!”

Pois bem, entre tantos vou começar pela minha família! Agradeço imensamente ao meu pai e minha mãe, meus exemplos de vida, meus heróis, que me deram todo amor e todo o suporte para que eu pudesse passar as manhãs, tardes e noites da minha vida estudando e me preparando para chegar até aqui! Às minhas irmãs, Daniela e Marina, por terem aguentado os momentos de fúria e guardado as palavras certas de incentivo tornando minha caminhada mais leve! Amo vocês! Ao André por ter me dado todo apoio e carinho! Mesmo quando eu não acreditei que era possível, quando eu não acreditei que daria conta de chegar ao final, ele acreditou em mim! Sempre ao meu lado me ajudando, me trazendo calma e pensando em soluções! Obrigada por todo carinho e companheirismo! Amo você!

Como não agradecer a minha querida orientadora, Silvia Passos, que me acolheu em seu laboratório e conduziu meu trabalho sempre com a palavra certa na hora certa! Ela reúne qualidades como competência, sensatez, ponderação e objetividade! Com ela não há meias palavras! Diz o que tem que ser dito, mas sempre com muita classe! Além do seu lado orientadora há um lado mãezona que une todos ao redor e nos defende com unhas e dentes! MUITÍSSIMO Obrigada

por tudo Silvia! Agradeço também a todos os colegas da angiogenese que estiveram comigo nessa jornada e que tiveram grande contribuição nessa vitória! Em especial a Paula, Polly e Suzi que estiveram ao meu lado sempre com muita paciência me ensinando tudo que sabiam sobre angiogenese e sobre a vida! Vocês são demais! Não posso deixar de agradecer ao Celsinho, Leandrinho e Luiza que foram parceiros de lab e sempre excelentes companhias!

Agradeço também a professora Maria de Fatima, minha primeira orientadora, que foi quem abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse adentrar no mundo da pesquisa científica! Obrigada por todos os ensinamentos que você me proporcionou e pela paciência! Como não podia deixar de ser agradeço aos colegas do laboratório de sinalização de cálcio em especial ao Emerson, meu grande professor e amigo! O primeiro que sentou comigo em uma bancada e me ensinou tudo o que eu sei sobre biologia molecular com a paciência que um pai tem por um filho! Depois disso esse chato se tornou um grande amigo! A Lili e Marisa, duas grandes amigas que estiveram comigo no lab, na cantina, na escada, na biblioteca, no confocal, na câmara escura, no Observatório, no Albanos, no Tizé dividindo bons e maus momentos e sempre me ajudando, me apoiando e me ensinando! Ao Doug, meu companheiro de lab e grande amigo! Juntou-se a equipe por último, mas desde então é inseparável! Apesar de ser o mais novo da turma, é um grande conselheiro! Está sempre de bom humor nos fazendo rir mesmo quando o momento não é dos mais alegres. À Ju que mesmo trabalhando em outro laboratório parecia que era da nossa equipe tamanha foi a afinidade!

Agradeço a equipe técnica Taquinho, Zezé, Cintia e Nilda por serem sempre muito prestativos em solucionar os problemas que aparecem para os alunos da pós! Peças fundamentais para a concretização de qualquer trabalho! À professora Silvia Guatimosim, sempre muito solícita abrindo as portas de seu laboratório para tudo que precisávamos enquanto trabalhávamos em colaboração!

Agradeço aos grandes amigos de toda a vida que sempre emprestaram o ouvido e o ombro! Se fosse listar todos eles (e assim deveria pois Todos me ajudaram de alguma forma durante essa caminhada) poderia acabar esquecendo de alguém que ficaria chateado comigo. Dessa forma, a todos aqueles que acompanharam essa trajetória obrigada de coração! Dentro desse grupo, agradeço em especial a Fe que acompanhou de perto esse processo e sempre me deu muita força e incentivo! A Lê que me ajudou muito no começo do mestrado dando dicas, falando da importância desse processo sem esconder que embora valoroso e gratificante, por vezes é penoso também!

Agradeço as agências de fomento que permitiram a concretização do meu trabalho!

Por fim, a minha ex-professora de graduação e hoje aluna de doutorado do nosso programa de pós-graduação, Mereciana, que foi a primeira pessoa que me mostrou a beleza da fisiologia humana e plantou a semente da curiosidade que me trouxe até aqui!

A todos que contribuíram de alguma forma para esse processo, Muito Obrigada!

**“O professor universitário deveria ser
ao mesmo tempo mestre e inventor.
Não bastava transmitir noções consagradas;
Era necessário produzir conhecimento!”
(Francisco de Lemos, reitor da universidade de Coimbra)**

Resumo

Inflamação e angiogênese são componentes chave do crescimento do tecido fibrovascular, um evento biológico que ocorre sob condições fisiológicas e patológicas, e exibe uma variabilidade considerável entre espécies e linhagens. Nosso grupo investigou nas linhagens de camundongos isogênicos (Balb/C) e heterogênicos (Swiss) a variabilidade da resposta do dipiridamol (DIP) no tecido fibrovascular. Os efeitos da droga na formação de vasos sanguíneos, recrutamento de células inflamatórias, deposição de colágeno e produção de citocinas foram determinadas no tecido fibroproliferativo induzido pelo implante de esponja em camundongos Swiss e Balb/c. A angiogênese, avaliada pelos níveis da hemoglobina (Hb) e pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), foi diferente entre as linhagens. Os implantes de camundongos Swiss tiveram maior conteúdo de hemoglobina e menor nível de VEGF. O tratamento sistêmico com dipiridamol exerceu efeito anti-angiogênico nos implantes de animais Balb/c, mas pró-angiogênico na linhagem Swiss. Nos implantes dos camundongos Balb/c a atividade da MPO foi seis vezes maior em relação a mesma atividade no implante de animais Swiss. As atividades das enzimas inflamatórias mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) foram reduzidas pelo tratamento com dipiridamol somente em implantes dos animais Balb/c. A quantidade de nitrito foi 40% maior nos implantes de animais Balb/c após o tratamento com DIP. As medidas de TNF- α foram similares nos implantes de ambas as linhagens e não foram reduzidos pelo DIP. Os níveis do fator de crescimento transformante β -1 (TGF- β 1) e a deposição de colágeno também variaram entre as linhagens. A linhagem isogênica teve níveis similares de citocinas e os implantes de camundongos Swiss apresentaram mais colágeno. O tratamento com dipiridamol

reduziu a deposição de colágeno somente em implantes de Balb/c. Nossos dados mostraram que o background genético influencia de forma marcante as resposta de angiogênese e inflamatória por meio do implante de esponja e pelos efeitos do dipiridamol sobre esses eventos.

Abstract

Inflammation and angiogenesis, key components of fibrovascular tissue growth, a biological event underlying both physiological (wound healing) and pathological conditions (tumor development, chronic inflammation) exhibit considerable variability among species and strains. We investigated whether the response of inbred and outbred mice strains to dipyridamole (DIP) on these processes would present similar variability. The effects of the drug on blood vessel formation, inflammatory cell recruitment, collagen deposition and cytokine production were determined on the fibroproliferative tissue induced by sponge implant in Swiss and Balb/c mice. Angiogenesis as assessed by hemoglobin-Hb and vascular endothelial growth factor-VEGF levels differed between the strains. Swiss implants had the highest hemoglobin content but the lowest VEGF levels. Systemic dipyridamole treatment exerted anti-angiogenic effect on Balb/c implants but pro-angiogenic effect on Swiss implant. The inflammatory enzyme activities myeloperoxidase-MPO (6-fold higher in Balb/c implants) and NAG were reduced by the treatment in Balb/c implants only. Nitrite levels were also higher in Balb/c implants 40% after DIP treatment. TNF- α levels were similar in the implants of both strains and were not reduced by DIP. Transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) levels and collagen deposition also varied between the strains. The inbred strain had similar levels of the cytokine but implants of Swiss mice presented more collagen. Dipyridamole treatment reduced collagen deposition in Balb/c implants only. Our data showing the influence of the genetic background on marked heterogeneity of inflammatory angiogenesis components and differential sensitivity to dipyridamole may provide some answers to clinical evidence for resistance to angiogenic therapy.

Lista de Abreviaturas

aFGF – Fator de crescimento de fibroblasto ácido

Ang-1 e Ang-2 – Angiopoietinas

bFGF – Fator de crescimento de fibroblasto básico

CT – Controle

DIP – Dipiridamol

ECs – Células endoteliais

eNOS – Enzima óxido nítrico síntase endotelial

EPCs – Células endoteliais progenitoras

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

IL – Interleucinas

IFN - γ - Interferon Gama

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

HE – Hematoxilina-eosina

Hb – Hemoglobina

HGF – Fator de crescimento do hepatócito

MCP 1- Proteína quimiotática para monócitos

MEC – Matriz extracelular

MPO – Mieloperoxidase

MMP – metaloproteinase

NAG – N-acetilglicosaminidase

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido nítrico síntase

O.D – Densidade óptica

PA – Ativador de plasminogênio

PDE – Fosfodiesterase

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PD-ECGF – Fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaquetas

PIGF – Fator de crescimento placentário

ROS – Espécies reativas do oxigênio

tPAs – Ativadores de plasminogênio teciduais

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

uPAs – Uroquinonas ativadoras de plasminogênio

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Ensaio de Angiogênese</i>	21
<i>Figura 2: Mecanismo de ação do dipiridamol</i>	29
<i>Figura 3: Protocolo Experimental</i>	42
<i>Figura 4 – Efeito do dipiridamol nos parâmetros angiogênicos em implantes de camundongos Balb/C e Swiss no conteúdo de hemoglobina intra-implante.</i>	44
<i>Figura 5 – Efeito do dipiridamol nos parâmetros angiogênicos em implantes de camundongos Balb/C e Swiss no conteúdo de VEGF intra-implante.</i>	44
<i>Figura 6 – Análise morfométrica do número de vasos sanguíneos intra-implante.</i>	45
<i>Figura 7 - Efeito do dipiridamol na atividade da enzima mieloperoxidase em implantes de animais Balb/C e Swiss.</i>	46
<i>Figura 8 - Efeitos do dipiridamol na produção da citocina pró-inflamatória TNF-α.</i>	46
<i>Figura 9 - Efeito do dipiridamol nos parâmetros inflamatórios nos implantes Balb/C e Swiss.</i>	47
<i>Figura 10 - Efeitos do dipiridamol na produção de citocina pró-inflamatória CCL2(MCP-1/JE).</i>	47
<i>Figura 11 - Efeito do dipiridamol na produção de nitrito em implantes de camundongos Balb/C e Swiss.</i> ...	48
<i>Figura 12 - Efeitos do dipiridamol na deposição de colágeno e nos níveis de TGFβ1 nos implantes de animais Balb/C e Swiss.</i>	49
<i>Figura 13 - Efeitos dos níveis de dipiridamol em TGFβ1 nos implantes Balb/C e Swiss.</i>	49
<i>Figura 14 - Efeito do dipiridamol na difusão da fluoresceína após injeção intradérmica do corante em camundongos da linhagem Balb/C e Swiss.</i>	50
<i>Figura 15 - Secções histológicas representativas em A, B, C e D (5μm, corado com H&E). As secções E e F foram ligadas ao anticorpo monoclonal CD31. Essas secções de tecido fibrovascular foram induzidas por implantes de esponja subcutâneos em camundongos Balb/C e Swiss.</i>	52
<i>Figura 16: Tabela</i>	59

Sumário

1- Introdução.....	13
1.1 Background Genético	14
1.1.1 - Heterogeneidade fenotípica entre linhagens de camundongos	14
1.2 – Inflamação	16
– Etapas da Resposta Inflamatória.....	17
1.3 – Angiogênese	19
1.3.1 – Regulação da Angiogênese.....	21
1.4 – Angiogênese e Inflamação.....	24
1.5 – Reparo Tecidual.....	25
1.6 – Fibrose	28
1.7 – Dipiridamol.....	29
1.7.1 – Inibição plaquetária	30
1.7.2 – Vasodilatação e Perfusão.....	31
1.8 – Modelo de Implante da Esponja	31
2- Objetivos	33
2.1 – Objetivo Geral	33
2.2 – Objetivos Específicos	33
3– Materiais e Métodos	34
3.1 – Animais.....	34
3.2 – Técnica de Implantação	34
3.2.1 – Implantes de Esponjas	34
3.2.1 – Técnica de Implante da Esponja em Camundongos.....	34
3.3 – Remoção dos Implantes.....	35
3.4 – Dosagem de Hemoglobina	35
3.5 – Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	35
3.6 – Avaliação da Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG).....	36
3.7 – Quantificação do Colágeno	37
3.8 – Quantificação de Citocinas (VEGF, TNF- α , TGF- β 1).....	38
3.9 – Quantificação do Nitrito	38
3.10 – Avaliação Histológica.....	39
3.11 – Avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo	40
3.12 – Análise Estatística	41
3.13 – Protocolo Experimental	41
4- Resultados	43
4.1 – Parâmetros Vasculares.....	43
4.2 – Parâmetros Inflamatórios.....	45
4.3 – Parâmetros Fibrogênicos	48
4.4 – Difusão da Fluoresceína	49
4.5 – Avaliação da Histologia.....	50
5 – Discussão	53
6 - Conclusões	60
7 - Referências Bibliográficas	61
8 - Anexo	77

1- Introdução

Um desafio fundamental na medicina é elucidar as bases das diferenças individuais em resposta a lesões e tratamentos. Tem sido proposto que fatores ambientais, epigenéticos e/ou genéticos, são determinantes e influenciam a susceptibilidade individual a doenças e os resultados de intervenções terapêuticas gerando uma heterogeneidade de respostas comportamentais, fisiológicas e moleculares. Alguns estudos já mostraram também que estas variações influenciam tanto a taxa de progressão e a severidade de processos patológicos, bem como a sensibilidade/resistência dos indivíduos a uma variedade de quimioterápicos. Em muitos processos patológicos incluindo, inflamação crônica, retinopatias, degeneração macular, crescimento tumoral, onde a neoformação vascular e a inflamação coexistem, há consideráveis variações individuais na indução de novos vasos sanguíneos entre espécies e linhagens animais. No entanto, há poucos estudos que avaliaram a influência da heterogeneidade genética na resposta farmacológica aos compostos com atividade anti-angiogênica e/ou anti-inflamatória. Uma gama de compostos com tais atividades e disponíveis no mercado tem sido reportada. Dentre eles, o dipiridamol, um fármaco utilizado primariamente como anti-agregador plaquetário exerce outros efeitos como vasodilatação, anti-oxidante e anti-inflamatório. Estas propriedades apontam o dipiridamol como um composto com potencial atividade na angiogênese inflamatória. Neste estudo avaliamos o efeito deste composto nos processos angiogênico, inflamatório e fibrogênico induzidos por implantes de esponja em duas linhagens de camundongos Balb/c (isogênico) e Swiss (heterogênico).

1.1 Background Genético

O background genético é o conjunto de genes e a totalidade das alterações cromossômicas dos fatores extracromossômicos existentes numa dada população. Embora todos os indivíduos de uma mesma linhagem contenham a mesma coleção de genes, sequências diferentes e interações entre os alelos influenciam fenótipos específicos. A heterogeneidade dos alelos *versus* os efeitos do background genético são frequentemente difíceis de distinguir em doenças genéticas do ser humano devido à composição genética que ainda é desconhecida em populações humanas. Em camundongos, os antecedentes genéticos podem ser facilmente controlados e, por isso, os efeitos dos genes modificadores e a diversidade de alelos são facilmente distinguidos¹. Para avaliar, portanto o impacto de alterações na atividade gênica, genes candidatos têm sido deletados ou superexpressos gerando modelos de animais geneticamente modificados particularmente, camundongos. Vários trabalhos relatam que a mesma alteração gênica produz fenótipos diferentes quando presentes em linhagens distintas destes animais^{2,3}.

1.1.1 - Heterogeneidade fenotípica entre linhagens de camundongos

Muitos parâmetros fisiológicos e patológicos em mamíferos são determinados pelo background genético. Há vários estudos que mostram que a mesma alteração gênica produz fenótipos diferentes quando presentes em diferentes linhagens. O background genético pode influenciar também na intensidade da resposta inflamatória e na resposta angiogênica a uma injúria. Foi observado que camundongos FVB, que tem uma resposta angiogênica menos intensa do que camundongos C57BL/6J, são mais resistentes ao crescimento de retinoblastomas

4.

Rohan et al. (2000) avaliaram a sensibilidade de diferentes linhagens de camundongos isogênicas a fatores angiogênicos utilizando o modelo de neovascularização da córnea. O estudo revelou que camundongos FVB apresentaram moderada angiogênese em relação aos camundongos da linhagem C57BL/6J. Além disso, foi observado que o background genético alterou a sensibilidade das linhagens a inibidores angiogênicos ⁵. Ward et al. 2007 mostraram também que fatores angiogênicos cerebrais e a resposta fisiológica à hipóxia crônica diferiam entre linhagens de camundongos comumente utilizadas⁶.

Recentemente, Marques et al. 2011 mostraram que angiogênese inflamatória induzida por implantes subcutâneos diferia entre camundongos Balb/c, Swiss e C57/BL. Foi observado, por exemplo, que o fenótipo angiogênico em camundongos Swiss é mais intenso comparado às outras duas linhagens. Ao contrário, a inflamação nos camundongos Balb/c é mais intensa do que a dos camundongos Swiss e C57/BL⁷. Assim, tem sido sugerido que a heterogeneidade genética desempenha um papel importante na regulação da angiogênese e este fator deve ser considerado no desenho experimental e interpretação dos resultados. Do ponto de vista da medicina translacional estes estudos sugerem que fatores genéticos determinam a heterogeneidade das respostas em níveis comportamentais, fisiológicos e moleculares em doenças envolvendo a neoformação vascular (inflamação crônica, retinopatias, degeneração macular, crescimento tumoral) ⁸.

1.2 - Inflamação

A inflamação é conhecida pelos quatro sinais e sintomas típicos da resposta a uma lesão, também conhecidos como sinais cardinais: rubor (vermelhidão) que ocorre em função da hiperemia, tumor (inchaço devido ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (aumento da temperatura decorrente de alterações no fluxo sanguíneo e atividade metabólica de mediadores celulares da inflamação) e dor (devido, em parte, associada às terminações nervosas).⁹.

A resposta inflamatória é um processo complexo em que alguns fatores e tipos celulares distintos funcionam de forma coordenada controlando o dano tecidual por agentes patogênicos, traumáticos ou tóxicos. O processo inflamatório é coordenado por moléculas pró e anti-inflamatórias que regulam a quimiotaxia, migração e proliferação celular. Em geral esse processo finaliza com o reparo, no entanto se ele não é corretamente coordenado ele evolui para uma inflamação crônica^{10, 11,12}.

A inflamação aguda assim como a crônica apresentam etapas semelhantes como irritação, alterações vasculares, exsudação plasmática e celular, lesões degenerativas e necróticas, proliferação conjuntiva e vascular reparadora e modificações das células do exsudato. Tais fenômenos têm seu início em momentos sucessivos, mas por vezes eles se superpõem durante o desenrolar do processo¹³.

- Etapas da Resposta Inflamatória

Quando ocorre uma injúria tecidual são liberados mediadores tais como citocinas, histamina, proteases e eucosanóides¹⁴. Os mastócitos, células que armazenam mediadores ou produzem esses mediadores através de outras células como, por exemplo, o endotélio, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células parenquimatosas ou do estroma, estão presentes em tecidos conjuntivos. As ações relacionadas são vasodilatação e extravasamento de líquidos, promovem adesão endotelial e maior recrutamento de células inflamatórias^{13,15}.

A vasodilatação favorece o aumento do fluxo sanguíneo local, da pressão hidrostática na microcirculação e, dessa forma, o extravasamento de líquido rico em proteínas para o espaço intersticial, chamado exsudato. No sangue ocorre uma hemoconcentração em virtude da redução de líquidos, tornando-o mais viscoso e seu fluxo mais lento (estase). Dessa forma, ocorre uma orientação periférica de neutrófilos ao longo do endotélio vascular, processo denominado marginação leucocitária¹¹⁻¹³. A marginação leucocitária representa o primeiro evento das alterações celulares da resposta inflamatória. Os mediadores inflamatórios imediatos promovem ativação endotelial, aumentando a expressão das moléculas de adesão. Esse processo favorece a formação de fileiras de leucócitos que rolam lentamente ao longo do endotélio vascular (rolagem) e aderem transitoriamente a ele. Os leucócitos são ativados por quimiocinas e com isso aumentam a avidéz de suas ligações às moléculas de adesão do endotélio (aderência). Em seguida, passam entre as células endoteliais adjacentes (transmigração ou diapedese). Uma vez no interstício, os leucócitos migram em direção a injúria por quimiotaxia.¹¹

Em grande parte das inflamações, além dos monócitos, as primeiras células a deixarem os vasos são predominantemente polimorfonucleares. Elas constituem as células predominantes do exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias incluindo família das interleucinas (IL), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon (IFN) são extensivamente produzidos por vários tipos celulares do sítio inflamatório, ligando e ativando receptores acoplados a proteína G nas células imunes ^{11,12}.

A ativação desses receptores desencadeia uma cascata de sinais intracelulares que alteram a morfologia e migração celular. Em seguida os monócitos migram para o sítio inflamatório por quimiotaxia, onde se diferenciam em células dendríticas e macrófagos. Os monócitos começam a migrar dos vasos após 18 a 24 horas da diapedese ser iniciada. Eles se acumulam rapidamente e, então, os macrófagos passam a ser as células predominantes após 48 horas ^{13,16}.

Os macrófagos irão produzir uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas em vários tipos celulares, incluindo células endoteliais (ECs), células epiteliais e células de origem mesenquimal. Os macrófagos liberam substâncias que ativam cascatas resultando na remodelação tecidual e recrutamento de leucócitos adicionais como linfócitos B e T citotóxicos ¹⁷.

Dentre essas substâncias ativadoras podem-se citar as espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio, proteases, quimiocinas, fatores da coagulação, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), citocinas fibrogênicas, e fatores da angiogênese ¹⁶.

A resposta inflamatória é regulada pelo balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios que coexistem no sítio da injúria. O estímulo que define a transformação da resposta inflamatória em um processo de reparo são sinais anti-inflamatórios locais, rápidos e reversíveis ¹⁸. Da mesma forma, se as moléculas pró-inflamatórias estiverem em maior número frente às anti-inflamatórias haverá maior produção de proteases, proteoglicanos, mediadores lipídicos e prostaglandinas que reforçarão esse processo ¹⁹.

1.3 - Angiogênese

Os vasos sanguíneos são importantes para o suprimento de oxigênio, nutrientes e constituem a porta para a ação do sistema imune. As células endoteliais que estão na parede desses vasos dão suporte para o crescimento e reparo dos mesmos ²⁰.

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de uma vasculatura pré-existente. Ela pode ocorrer por brotamento ou por subdivisão intravascular (intussuscepção) ²¹. O crescimento de novos vasos sanguíneos durante a embriogênese ocorre principalmente através de vasculogênese e angiogênese. Em adultos, a angiogênese é estimulada durante muitos processos fisiológicos como reparo de feridas, remodelamento e regeneração tecidual e o ciclo reprodutivo feminino ²².

Os vasos sanguíneos são formados por células endoteliais que estão em contato direto com o fluxo sanguíneo. Sob as células endoteliais encontram-se os pericitos, as células musculares lisas, a membrana basal e a matriz extracelular. A função, a composição e o fenótipo dos vasos sanguíneos variam de acordo com sua localização, com a estrutura vascular, os constituintes celulares, a membrana basal e a matriz extracelular ²³.

Na fase embrionária, o início do crescimento vascular ocorre quando células vasculares precursoras, chamadas de angioblastos, migram para locais distintos, diferenciam-se e reúnem-se em cordões endoteliais denominado de vasculogênese ²⁴.

A literatura revela que células endoteliais precursoras contribuem para a formação de novos vasos em tecidos isquêmicos, nos ovários durante a ovulação e formação do corpo lúteo, ou durante a cicatrização de feridas e o crescimento de placas ateroscleróticas ²⁵.

O crescimento subsequente, expansão e remodelamento desses vasos primitivos em uma rede vascular madura são referidos como angiogênese ²⁴. Como a angiogênese é definida pela formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, ela se distingue da vasculogênese. Finalmente, mais modificações funcionais das grandes artérias ocorrem durante a arteriogênese como a adição de uma grossa camada muscular concomitante com a aquisição de propriedades viscoelásticas e vasomotoras ²⁵.

Em indivíduos adultos, em condições normais, as células endoteliais permanecem em estado de quiescência ²⁶. Porém, quando estimuladas adequadamente, elas se tornam ativas e iniciam uma cascata de eventos que culminam na neoformação vascular. Esse estado de quiescência das células endoteliais está associado a um equilíbrio entre fatores endógenos pró e anti-angiogênico. No entanto, esse equilíbrio pode ser rompido por fatores químicos ou físicos como, por exemplo, injúria tissular, hipóxia, alteração na liberação de citocinas, fatores de crescimento e alterações do fluxo sanguíneo e do formato celular, desencadeando atividade angiogênica ou anti-angiogênica ^{27,28}. A regulação da proliferação e migração celular também tem sido descrita pela

interação das células endoteliais com os pericitos e/ou células musculares lisas constituintes dos vasos ²⁸⁻³⁰. Elas podem ainda interagir com o colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos, alterando a expressão fenotípica de capilares ³¹. Os componentes da matriz extracelular também podem se ligar e estocar fatores de crescimento, o que dificulta a utilização destes pelas células endoteliais ^{32,33}.

O inadequado crescimento ou manutenção dos vasos pode levar ao aparecimento de doenças isquêmicas como infarto do miocárdio, patologias neurodegenerativas ou desordens associadas à obesidade enquanto que o crescimento vascular excessivo ou o remodelamento anormal podem promover prejuízos como câncer, desordens inflamatórias e doenças oftalmológicas ^{34,35}.

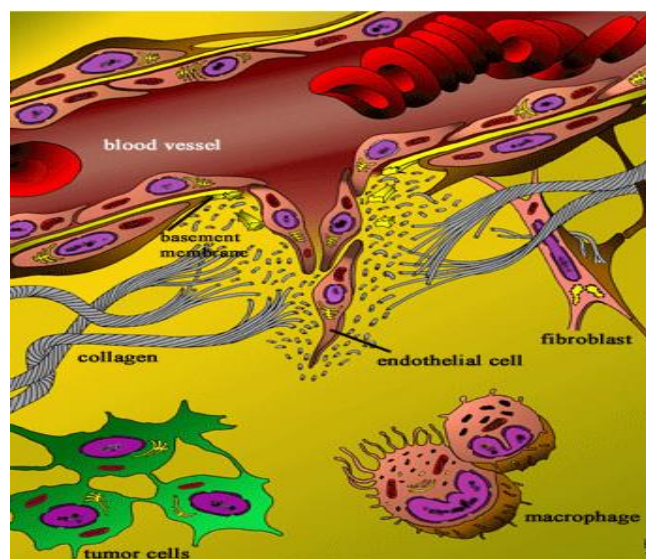


Figura 1: Ensaio de Angiogênese

1.3.1 – Regulação da Angiogênese

O começo da angiogênese se dá com a dilatação de vasos pré-existentes, em especial, vênulas e capilares. Quando ocorre o estímulo angiogênico, as

células endoteliais são ativadas formando projeções em sua superfície, ocorre um aumento no número de organelas intracelulares e na produção de enzimas proteolíticas que fragmentam a membrana basal e a matriz extracelular, possibilitando a migração e proliferação das células endoteliais. Em seguida passa por etapas como: formação do lúmen, conexão com outro vaso, formação da membrana basal e, posteriormente, ocorre a migração dos pericitos ^{25, 36,37}.

Esses mecanismos de regulação envolvem uma sequência de eventos influenciados por sinais biológicos como hipóxia ou por citocinas e fatores de crescimento ^{38,39}. Os fatores de crescimento fazem parte de uma subclasse de citocinas que estimulam de forma específica a migração e proliferação celular ^{40,41}. Dessa forma, a coordenação da angiogênese é acompanhada por uma variedade de ativadores e inibidores que de forma sequencial sincronizam uma complexa série de eventos ⁴². Esse processo requer a ativação de muitos receptores e numerosos ligantes, incluindo o fator de crescimento placentário (PIGF), fator de crescimento de fibroblasto ácido e básico (aFGF e bFGF, respectivamente), angiopoietinas (principalmente Ang-1 e Ang-2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), dentre outros ⁴³⁻⁴⁷. Apesar do grande número de fatores responsáveis pelo processo angiogênico, a sinalização do VEGF nas células endoteliais representa papel fundamental ⁴⁸. O VEGF atua pela atração nas células endoteliais por meio de seus receptores tirosina-quinase VEGFR-1 e VEGFR-2. Embora ela se ligue aos dois receptores, muitas de suas funções estão ligadas ao VEGFR-2, assim induzindo migração, sobrevivência e proliferação das células endoteliais pré-existentes e a formação de uma nova vasculatura ⁴⁹⁻⁵¹. Além disso, o VEGF é também o principal fator envolvido na

mobilização de células endoteliais progenitoras (EPCs) da medula óssea para a circulação periférica e sítios angiogênicos, onde elas diferenciam e integram à nova vasculatura ^{52,53}.

Os fatores angiogênicos são aumentados por vários estímulos incluindo hormônios esteroides, aumento da pressão arterial, lesões ou estresse. A ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é uma enzima induzível e constitutiva, responsável pelo aumento de prostaglandinas durante a inflamação. Ela também contribui para a angiogênese por regular a produção de VEGF, indicando, portanto, que a inflamação pode ser um dos moduladores da angiogênese ⁵⁴.

O VEGF atua também aumentando a permeabilidade vascular por meio da formação de organelas vesículo-vacuolares nas células endoteliais, o que permite o extravasamento de proteínas proteolíticas plasmáticas para o meio extravascular. Tais enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular permitindo a penetração endotelial no espaço perivascular ⁵⁵.

Para que a migração das células endoteliais ocorra é necessário o afastamento dos pericitos ou células musculares lisas que envolvem a camada endotelial, a degradação proteolítica da membrana basal do vaso original e a remodelação do estroma perivascular. Dentre as substâncias responsáveis por esses processos estão a angiopoietina-2 e proteases (ativador de plasminogênio, quinases e metaloproteinases). O processo de invasão e migração das células endoteliais requer uma atividade cooperativa do sistema ativador de plasminogênio (PA) e das metaloproteinases ⁵⁶. As uroquinonas ativadoras de plasminogênio (uPAs) e os ativadores de plasminogênio teciduais (tPAs) são proteases com serina que convertem o plasminogênio em plasmina. A plasmina

degrada vários componentes da matriz extracelular, incluindo fibrina, fibronectina, laminina e proteoglicanos, além de ativar várias metaloproteinases ^{57,58}.

Em seguida ocorre a proliferação dessas células para a formação do lúmen tubular. Desse ponto em diante começam a aparecer ramificações com eventual conexão entre os brotos e uma rede de novos tubos é formada. A última etapa consiste na maturação e estabilização do vaso, na qual, novos componentes da matriz extracelular são produzidos e depositados sob a forma da nova membrana basal. A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é alcançada após a migração de células mesenquimais para a proximidade dos novos vasos e a posterior diferenciação desse tipo celular em pericitos ou células musculares lisas, assim como pela regeneração da matriz extracelular e membrana basal ^{59,60}.

1.4 – Angiogênese e Inflamação

Durante uma resposta inflamatória, se há permanência do estímulo lesivo, ocorre a cronificação do processo inflamatório, que por sua vez é caracterizado por um aumento de macrófagos no local, proliferação de fibroblastos o que aumenta a síntese de matriz, a angiogênese e a lesão tecidual. Esse aumento na angiogênese propicia um aumento do infiltrado inflamatório, o qual libera substâncias pró-angiogênicas, e assim, cria-se um ciclo vicioso ⁶¹.

A angiogênese sustenta a inflamação através do fornecimento de oxigênio e nutrientes para as necessidades metabólicas das células presentes no sítio inflamatório. Isso ocorre pela produção de NO, um agente inflamatório produzido pela ativação da NO síntase induzível (iNOS) em células inflamatórias, que está relacionado ao estímulo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular ¹². Outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas durante a

inflamação são potentes ativadores das células endoteliais vizinhas, aumentando nessas a expressão de moléculas de adesão importantes para o processo de rolagem, ativação, adesão e transmigração das células inflamatórias sanguíneas para a área da lesão ⁶².

Os mediadores inflamatórios produzidos pelas células imunes atuam sobre fibroblastos e células endoteliais. Esses por sua vez liberam fatores angiogênicos, favorecendo estímulo indireto para que a angiogênese ocorra. As células inflamatórias também podem liberar fatores angiogênicos como VEGF, angiopoietina, b-FGF, HGF, PDGF, TGF- β , TNF- α , dentre outros os quais exercerão efeitos mitogênicos e migratórios sobre o endotélio ^{10,62}.

1.5 – Reparo Tecidual

A capacidade de reparar danos causados por agentes tóxicos ou inflamatórios é crítica para a sobrevivência de um organismo. A resposta inflamatória não é somente útil para eliminar agentes lesivos como também para estimular o processo de reparo ¹⁶. O conceito de reparo refere-se a um processo complexo e dinâmico que na maior parte das vezes resulta na restauração da arquitetura tecidual e de sua função após a lesão ^{63, 64}.

Existem quatro respostas que podem ocorrer após uma lesão: regeneração; cicatrização deficiente; cicatrização excessiva; reparo normal. A regeneração diz respeito ao processo que ocorre quando há perda da estrutura e função de um tecido, mas o organismo possui a capacidade de restabelecê-lo exatamente como era antes da lesão. A cicatrização deficiente ocorre quando há deposição insuficiente de tecido conectivo e matriz enfraquecida. Já a cicatrização excessiva ocorre quando há deposição excessiva de tecido conectivo que resulta em alteração da estrutura tecidual e, dessa forma, gera a perda da

função. Um exemplo são as fibroses e aderências. No reparo normal há o restabelecimento anatômico do tecido por meio do equilíbrio entre a formação e o remodelamento da cicatriz ⁶⁵⁻⁶⁸.

A inflamação, conforme já foi descrito, possui uma fase inicial marcada pela liberação de mediadores inflamatórios, alterações vasculares e pelo infiltrado predominante de neutrófilos nas primeiras 24 horas e uma fase tardia conceituada em aproximadamente 48 horas após o início da lesão com predomínio de macrófagos no sítio lesivo. A presença de macrófagos é um indicio da finalização da fase inflamatória e o início da fase proliferativa ⁶⁹.

A fase proliferativa tem como células principais os fibroblastos. Essas células de origem mesenquimal são responsáveis por produzir nova matriz necessária para restaurar a estrutura e função do tecido lesado. A liberação de interleucinas, FGF, TNF- α e TNF- β pelas plaquetas e células inflamatórias (macrófagos e linfócito T) são fundamentais para a fase proliferativa, entretanto o principal regulador das funções dos fibroblastos é o TGF- β ⁷⁰. O TGF- β aumenta a transcrição de genes para colágeno, proteoglicanos, fibronectina e, assim, aumenta a produção de proteínas para a matriz. Ao mesmo tempo ele diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz e estimula o inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP) ⁷¹.

A matriz extracelular é composta inicialmente de fibrina e fibronectina e posteriormente os fibroblastos sintetizam glicosaminoglicanos, proteoglicanos, colágeno e outras proteínas que compõem o tecido de granulação ⁷²⁻⁷⁴. Os fibroblastos possuem um pico de atividade proliferativa. Quando esse pico é alcançado, eles se diferenciam em um fenótipo contrátil chamado miofibroblasto ^{75,76} que permanece proliferando e sintetizando colágeno ⁷⁴. O colágeno que é

depositado em um primeiro momento é mais fino e está orientado paralelamente à pele. Com o decorrer do processo de cicatrização, o colágeno depositado é reabsorvido e um colágeno mais grosso e organizado paralelamente às linhas de tensão toma o lugar do primeiro. Essas alterações são acompanhadas com um aumento da força tensora da ferida indicando uma correlação positiva com a espessura do colágeno e sua orientação, assim como com sua força tensora que determinam a fase de remodelamento ^{77,78}.

À medida que o tecido de granulação preenche a área lesada, o número de células inflamatórias diminui e os fibroblastos e células endoteliais continuam a sintetizar fatores de crescimento da matriz extracelular. Os macrófagos desempenham um papel central nesse processo. Elas englobam células apoptóticas de forma rápida e eficiente, intermedeiam a morte de células do estroma, parênquima e células imunológicas, engajando-se no programa de morte celular que resulta em apoptose ^{79,80}.

Devido a sua alta atividade metabólica no sítio lesivo há um aumento da demanda por oxigênio e nutrientes. Fatores locais no microambiente da lesão como PH reduzido, redução da tensão de oxigênio e aumento de lactato atuam sobre as células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais vasculares promovendo a liberação de fatores como VEGF, bFGF e TGF- β necessários para induzir angiogenese ⁸¹⁻⁸³.

A resposta angiogênica é essencial para o reparo tecidual normal, pois além de fornecer nutrientes e células inflamatórias para o tecido lesado, os novos vasos sanguíneos facilitam a retirada do material residual e auxiliam no desenvolvimento do tecido de granulação ⁸⁴.

1.6 – Fibrose

A fibrose pode ser definida como uma cicatrização com deposição excessiva de componentes da matriz que resulta em destruição da arquitetura normal do tecido e comprometimento da função tecidual.

O desenvolvimento da fibrose segue uma via similar a cicatrização normal de feridas. Entretanto, pode haver uma progressão crônica da doença que resulta em deposição excessiva de componentes da matriz extracelular sem resolução. A fibrose geralmente se desenvolve após um insulto inicial que leva a lesão celular e aumento na deposição de matriz comprometendo a função e eventualmente levando a morte celular ⁸⁵.

A resposta fibrótica parece ser determinada por três fatores: Um estímulo ou insulto contínuo (sugerindo que o processo em si é um evento em curso), síntese excessiva de colágeno e outros componentes da matriz extracelular e diminuição da resolução devido a uma baixa regulação das enzimas degradativas envolvidas na remoção do tecido cicatricial⁸⁵.

Muitos problemas clínicos estão associados à formação excessiva de cicatriz como queloides, cicatrizes hipertróficas, esclerodermia, estenoses esofágicas, estenose uretral, cirrose hepática, aterosclerose, doença de Crohn's, encapsulamento de implantes mamários e aderências ⁶⁹. Por isso, compostos que possuam propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogênicas e/ou anti-fibrogênicas apresentam potencial valor terapêutico para prevenir e/ou atenuar o processo.

1.7 - Dipyridamol

O dipyridamol (DIP), que possui o nome comercial de persantin, é utilizado há décadas na clínica com indicação para angina no peito, enfermidades tromboembólicas, claudicação intermitente, insuficiência coronariana devido, especialmente, ao seu efeito anti-trombótico.

É um inibidor de fosfodiesterase (PDE) que aumenta os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e guanina monofosfato cíclica (GMPc) ⁸⁶. Além disso, ele inibe principalmente a PDE 5 e PDE 6 envolvidas na hidrólise de GMPc ⁸⁷.

O mecanismo de ação do dipyridamol não é completamente compreendido e pode ser múltiplo. DIP inibe o transportador de nucleotídeos responsáveis pela absorção celular de adenosina.

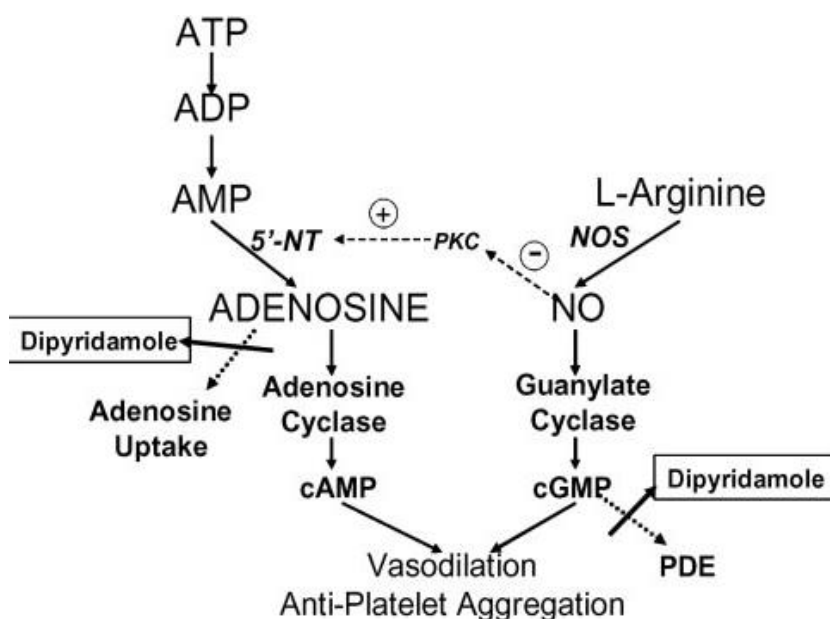


Figura 2: Mecanismo de ação do dipyridamol

Gamboa et al, 2008

Este transportador explica a meia-vida curta da adenosina e o seu bloqueio pelo dipyridamol resulta em grandes níveis extracelulares de adenosina e a potenciação de suas ações. O DIP, portanto, poderia atuar através da

potenciação da ação desses mediadores que por sua vez, trabalham através do GMPc também relacionado ao mecanismo do óxido nítrico (NO) ⁸⁶

É possível que o dipiridamol também funcione potencializando os efeitos do óxido nítrico que é outro potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Apesar de o DIP ser considerado um inibidor seletivo da PDE 5, uma isoenzima que hidrolisa GMPc, estudos recentes indicam isoenzimas PDE que hidrolisam AMPc também são sensíveis ao DIP ⁸⁶. O dipiridamol pode exercer ações como inibidor plaquetário, vasodilatador, anti-oxidante e anti-inflamatório ⁸⁷.

1.7.1 – Inibição plaquetária

A adenosina é liberada a partir de células da parede vascular de plaquetas para o espaço extracelular como um produto da decomposição de adenosina trifosfato (ATP). Os nucleotídeos adenina quando liberados são rapidamente convertidos em adenosina por nucleases. No sangue circulante, adenosina livre é rapidamente removida do plasma por um transportador específico encontrado em células vermelhas do sangue. Em doses clinicamente relevantes, DIP inibe a captação da adenosina em 90% nas células vermelhas do sangue e aumenta nos níveis plasmáticos em 60% ⁸⁶. A inibição atinge no máximo 80%, sendo dose-dependente em concentrações terapêuticas (0,5 - 2 mg/ml). Conseqüentemente, há um aumento local da concentração de adenosina que atua no receptor A2 das plaquetas estimulando adenilil ciclase em plaquetas aumentando os níveis intracelulares de AMPc, que é um potente inibidor da ativação plaquetária. O DIP pode aumentar os níveis intracelulares de AMPc nas plaquetas impedindo a quebra de AMPc via inibição de PDE. A diminuição da agregação plaquetária reduz o consumo de plaquetas aos níveis normais ⁸⁸.

1.7.2 – Vasodilatação e Perfusão

Através da inibição das PDE, o DIP aumenta os efeitos vasodilatadores GMPc dependentes. Ele também pode estimular a biossíntese e a liberação de prostaciclina (PGI₂) do endotélio por aumento intracelular de AMPc que não é somente um inibidor plaquetário como também um vasodilatador. A PGI₂ é gerada por uma via ciclo-oxigenase dependente em uma variedade de células, incluindo as células endoteliais ⁸⁶. Além disso, o dipiridamol reduz a trombogenicidade das estruturas subendoteliais pelo aumento da concentração do mediador 13-HODE (ácido 13- hidroxioctadecadienóico) ⁸⁷.

1.8 – Modelo de Implante da Esponja

O modelo de implante de esponja na região subcutânea de camundongos foi descrito primeiramente por GRINDLAY & WAUGH em 1951⁸⁹. Posteriormente, foi modificado por ANDRADE et al. em 1987⁹⁰.

Uma variedade de implante de matrizes esponjosas e polímeros têm sido utilizados para induzir e estudar a angiogênese inflamatória, pois o corpo estranho induz a formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos ⁹⁰. Dentro desses é possível citar a matriz sintética de poliéster poliuretano, a esponja de polivinil e a de acetil polivinil. Em um sistema experimental esses materiais provem um ambiente de dimensões definidas permitindo a invasão de várias células de reparo e a formação de um tecido fibrovascular assim como a análise bioquímica dos fluidos coletados, bem como o efeito de fármacos sobre o processo ⁹¹.

Esse modelo tem sido utilizado por ser facilmente reprodutível e possibilitar objetividade na avaliação da neovascularização, bem como o monitoramento

contínuo do processo, além de permitir a investigação morfo-funcional do processo em condições normais e patológicas.

A avaliação do desenvolvimento de estruturas vasculares na esponja pode ser feita a partir da estimativa do desenvolvimento do fluxo sanguíneo utilizando-se um marcador ou a partir da dosagem do conteúdo de hemoglobina, utilizando-o como índice indireto de vascularização ⁹². A análise histológica associada a estudos imunohistoquímicos e morfométricos apresenta-se também, como aliada interessante para a avaliação da angiogênese.

Considerando a heterogeneidade genética na resposta angiogênica a compostos e as ações do DIP na modulação de eventos vasculares, nosso projeto objetivou investigar a influencia do background genético na angiogênese inflamatória induzida por implantes de esponjas em resposta a esse composto.

2- Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a influência da heterogeneidade genética na angiogênese, inflamação e fibrogênese induzidas por implantes de esponjas e tratadas com dipiridamol.

2.2 – Objetivos Específicos

1- Caracterizar o processo inflamatório, angiogênico e fibrogênico em implantes subcutâneos em camundongos Swiss e Balb/c, tratados e não tratados com DIP, utilizando parâmetros celulares, bioquímicos e morfológicos.

2- Comparar os níveis de marcadores inflamatórios, angiogênicos e fibrinogênicos no tecido fibrovascular de camundongos das linhagens Swiss e Balb/C, tratados ou não.

3- Avaliar e comparar características histológicas dos implantes nas duas linhagens utilizando técnicas Imunohistoquímica, para a determinação da celularidade, presença de vasos sanguíneos e infiltração de células inflamatórias.

3- Materiais e Métodos

3.1 – Animais

Foram utilizados 10 camundongos de cada linhagem, Balb/c e Swiss, machos que pesavam aproximadamente 25 gramas e 35 gramas em média, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses animais foram escolhidos por serem as linhagens mais utilizadas em testes para avaliar a resposta com fármacos. Os animais foram colocados em gaiolas individuais, com ração e água “ad libitum”. O ciclo claro-escuro foi de 12/12hs.

3.2 – Técnica de Implantação

3.2.1 – Implantes de Esponjas

Discos de esponja de poliéster poliuretano (Vitafoam Ltd Manchester, UK) previamente confeccionados nas medidas de 5 mm por 8 mm foram conservados em álcool 70% v/v por 24 horas e posteriormente foram fervidas em água destilada por 30 minutos antes da implantação⁹⁰.

3.2.1 – Técnica de Implante da Esponja em Camundongos

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (150 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) da fabricante Syntec e sob o efeito do anestésico os animais foram submetidos à tricotomia na região dorsal. Em seguida, uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita na pele dos camundongos e a esponja foi inserida na camada subcutânea da região do dorso. Foi realizada a sutura do lócus cirúrgico e após os procedimentos supracitados os animais foram mantidos em gaiolas individuais, foram aquecidos para o restabelecimento de suas funções vitais⁹⁰.

3.3 – Remoção dos Implantes

No 7º dia após a implantação os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico e logo após foi realizada a remoção dos implantes. Esses foram pesados e processados para estudos histológicos e bioquímicos.

3.4 – Dosagem de Hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina por meio do implante quantifica de forma indireta a neovascularização formada na esponja e nos tecidos que circundam a mesma. Essa medida tem sido utilizada para determinar o índice de vascularização em modelos de angiogênese. A técnica que utiliza como método o reagente de Drabkin foi desenvolvida em 1932 e adaptada para estimar o índice angiogênico dos animais⁹²⁻⁹⁶. Os implantes foram homogeneizados (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2,0 mL de reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin – Kit de dosagem de hemoglobina Labtest). As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 1500 rpm e os homogenatos resultantes foram filtrados em membranas GV Durapore de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda de 540 nm por meio do Leitor de Elisa. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão e os resultados foram expressos em concentração de microgramas de hemoglobina por miligrama de peso úmido de implante.

3.5 – Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Após sete dias a presença de neutrófilos é um indicador de resposta inflamatória. Esse tipo de célula possui função fagocítica, contribuindo para eliminação de detritos. Para a determinação do acúmulo de neutrófilos, determina-se a atividade da mieloperoxidase (MPO), como descrito anteriormente

^{103,105}. É possível a visualização desse acúmulo de células inflamatórias por meio da análise histológica. Nela podemos perceber a presença dessas células na esponja implantada assim como sua resposta após o tratamento com dipiridamol.

Para a dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase, utilizamos a amostra que continha a esponja e a solução tampão. O sobrenadante foi desprezado e o disco de esponja foi dividido em fragmentos iguais. As partes foram pesadas e utilizadas para dosagem da atividade dessas enzimas.

Inicialmente, o sedimento foi homogeneizado e ressuspenso em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio, pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M de NaEDTA) e centrifugado a 12000 G durante 10 minutos. Foram retirados então 300 µL do sobrenadante e adicionados 600 µL de tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,40 contendo 0,5% de hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB)).

A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada por meio da mudança de absorvância (densidade óptica; OD) a 450nm utilizando 100 µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), preparada em DMSO em uma concentração final de 1,6 mM e 100 µL de substrato H₂O₂ na concentração final de 0,3 mM, dissolvida em tampão fosfato (pH 5,4). A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de H₂SO₄ (4M) e quantificada colorimetricamente a 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por miligrama de tecido úmido.

3.6 – Avaliação da Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG)

A mensuração da atividade de células mononucleares nos implantes de esponjas e plasma foi realizada avaliando-se a atividade da enzima N-

acetilglicosaminidase, presente em altos níveis em lisosomas de macrófagos ativado¹⁰⁶. O tecido foi homogeneizado em uma solução de 1mL de NaCl (0,9% wv-1) contendo 0,1% v/v-1 Triton X-100 e centrifugado (3000 g; 10 min 4°), por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram incubadas com 100 µL de p-nitrophenyl-N-acetyl-β- glucosaminide, preparado em um tampão de citrato-fosfato (pH 4,5) em uma concentração final de 2,34 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M pH 10,6. Para a realização do ensaio, foi adicionado 100 µL das amostras em duplicada a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida), diluído em tampão citrato/fosfato PH=4,5. Posteriormente, a placa foi incubada a 37° C durante 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2M, pH= 10,6. A absorbância foi medida por leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por grama de tecido úmido.

3.7 – Quantificação do Colágeno

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada colorimetricamente baseada na reação de picrossirius red. As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com tampão (1mL Triton X, pH 7,8). Em seguida, foram homogeneizadas e centrifugadas. Posteriormente, foram adicionados 50µL do reagente picrossirius red a 100 µL da amostra. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-picrossirius red foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos.

Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol (99% puro e livre de metanol) e o complexo colágeno-corantes foi reconstituído em 1mL de reagente alcalino (NaOH 0,5M). A absorbância foi

quantificada a 540nm em leitor de microplacas (Thermoplate). A quantificação de colágeno pode ser determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando padrão de gelatina e os resultados expressos em μg de colágeno por mg de implante.

3.8 – Quantificação de Citocinas (VEGF, TNF- α , TGF- β 1)

Para a determinação dessas citocinas nos implantes foram utilizados amostras de 1mL de esponjas maceradas e coletados 80 μL do sobrenadante desses implantes. Para a realização do ensaio, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicada à placa de ELISA que continham um anticorpo monoclonal específico. Em seguida, foi adicionado um anticorpo de detecção. Após realizar a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram, uma solução de substrato foi adicionada a placa de ELISA (50 μL de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio e 10mg/ml de OPD).

A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com 50 μL de ácido sulfúrico (2N) e a intensidade da cor será quantificada a 540nm em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos como pg de citocina por mg de peso úmido ou ml de soro.

3.9 – Quantificação do Nitrito

A liberação de NO foi avaliada indiretamente pela mensuração dos níveis de nitrito de acordo com o método de Green et al., 1982. Os implantes de esponja foram removidos, pesados e incubados por 15 minutos a 37°C com PBS (500 μL). O meio de incubação (100 μL) foi misturado com 10 μL de reagente de Griess (0.1% N-1-naphthylediamine, 1% sulfanilamide em 5% H₃PO₄) e a densidade óptica foi mensurada em 540 nm. A quantidade de nitrito no meio de incubação

foi calculada usando nitrito de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US) como padrão.

3.10 – Avaliação Histológica

Os implantes de esponja de um grupo separado de camundongos foi cuidadosamente retirado, dissecado para que ficasse livre de tecido aderente e fixado em formol tamponado a 10% p/v em solução salina por no mínimo 48 horas e processados para inclusão em parafina. Secções (5µm) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e processadas para estudo em microscópio de luz. As reações de Imunohistoquímica (IHQ) para a detecção de células endoteliais e vasos sanguíneos foram realizadas usando o anticorpo monoclonal CD31 (Fitzgerald, MA, USA). Secções do tecido (5m) foram desparafinadas e a recuperação do antígeno foi realizada em tampão de citrato (PH 6), os pedaços foram fervidos nesse tampão por 25 minutos a 95°C e resfriado por uma hora no mesmo tampão. Secções foram incubadas por 5 minutos em 3% de peróxido de hidrogênio para anular a peroxidase endógena do tecido. A ligação não específica foi bloqueada usando soro de cabra normal durante 10 minutos (1:10 em solução salina tamponada com fosfato) com 1% de albumina de soro bovino (em tampão fosfato salino). As secções foram então imunocoradas com o anticorpo monoclonal CD31 (diluição 1:40, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 60 minutos a temperatura ambiente. Após serem lavadas em tampão Tris-HCl, as secções foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com Streptavidina-HRP Universal Link biotinilado (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

As secções foram coradas com hematoxilina e eosinas e montadas em Permount (Fisher Scientific; NJ, EUA). A imunocoloração foi realizada manualmente, e o baço foi utilizado como controle positivo. Os controles

negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário, resultando em nenhuma coloração detectável. A expressão destas proteínas foi avaliada com base no grau de imunomarcção citoplasmática em células endoteliais que formam um lúmen em seis campos de alta potência, independentemente da intensidade de coloração (400x). Para realizar a análise morfométricas, imagens de secções transversais obtidas de 15 campos (8533 μm^2) foram capturados com uma objetiva planapochromatic (40x) em microscopia de luz (aumento final = 400x). As imagens foram digitalizadas através de uma microcâmara TK-1270/JCB JVC e transferidas para um analisador (Kontron Electronics, Carl Zeiss - KS300 versão 2). Um vaso contável foi definido como uma estrutura com um lúmen contendo glóbulos vermelhos ou não.

3.11 – Avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo

O princípio da técnica baseia-se na difusão de um marcador fluorescente aplicado em um tecido vascularizado. Quanto maior a difusão do marcador, maior o fluxo sanguíneo. Esse procedimento foi realizado no dorso dos animais anestesiados por meio de uma aplicação intradérmica de fluoresceína sódica com o objetivo de verificar se o background genético distinto dos camundongos poderia determinar uma resposta diferencial ao dipiridamol. Inicialmente foi coletada uma amostra de sangue da veia caudal do animal antes da aplicação da fluoresceína para ser utilizado como parâmetro basal. Em seguida, uma solução estéril (10 μl) de fluoresceína sódica (Sigma, USA; 1%) foi injetada e amostras de sangue de 5 μl foram coletadas da veia caudal nos tempos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 min. após a injeção.

Essas amostras foram misturadas em 1 mL de solução salina isotônica, centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para a determinação da

fluorescência por minuto através de um fluorímetro Jeway (modelo 6200) a uma taxa de excitação/emissão de 485/520. Os resultados foram expressos como pico de fluoresceína na circulação sistêmica. Cinco animais de cada linhagem foram utilizados para padronizar os parâmetros. No procedimento seguinte os animais receberam via gavagem uma dose de dipiridamol (200mg/Kg) e foram submetidas ao mesmo procedimento.

3.12 – Análise Estatística

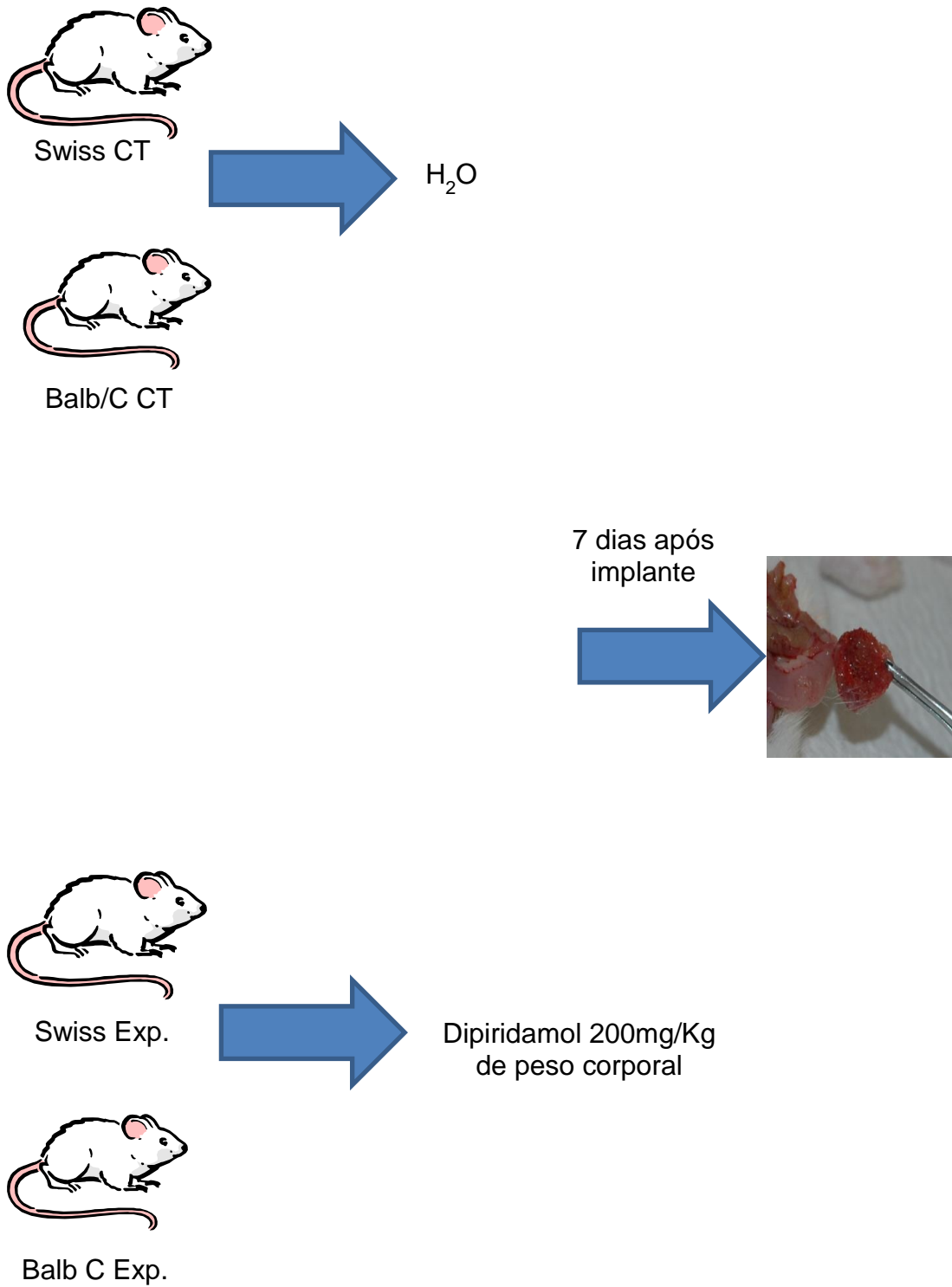
Todos os ensaios propostos foram validados por testes estatísticos adequados a cada modalidade (os dados foram submetidos a teste de distribuição normal). Os resultados foram expressos em média \pm SEM.

Comparações foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguida por fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

3.13 – Protocolo Experimental

Os animais foram separados em dois grupos, controle e experimental, nas linhagens Balb/c e Swiss. Após a manipulação cirúrgica para o implante da esponja, os animais permaneceram 24 h em observação. Após este período iniciou-se o tratamento com dipiridamol na concentração de 200mg/Kg de peso corporal para os grupos experimentais e a administração de água para os grupos controle. O volume da droga assim como do veículo foram igualmente administrados para todos os grupos através do método de gavagem. Ambos foram administrados por seis dias e no 7º dia após o implante os animais foram sacrificados e a esponja foi retirada para a análise do seu conteúdo.

Figura 3: Protocolo Experimental



4- Resultados

4.1 – Parâmetros Vasculares

A análise dos parâmetros vasculares foi realizada por meio da quantificação do conteúdo de hemoglobina (Hb) presente no implante, da análise morfométrica do número de vasos e da quantificação da citocina pró-angiogênica VEGF. A mensuração de hemoglobina avalia de forma indireta a neovascularização por meio do método de Drabkin.

Os resultados demonstram que na esponja controle a mensuração de Hb foi maior na linhagem Swiss frente a linhagem Balb/C. As doses diárias de dipiridamol (200mg/Kg) administradas por meio da gavagem para as duas linhagens reduziram o conteúdo de Hb dos implantes na linhagem Balb/C, enquanto na linhagem Swiss houve um aumento do mesmo, indicando uma redução da neovascularização em uma linhagem e o aumento em outra (Fig. 4).

Sabendo-se que o VEGF é uma citocina com função pró-angiogênica e que é utilizado como marcador molecular da angiogênese, a dosagem desta molécula em implantes de animais tratados e não tratados com dipiridamol poderia corroborar como parâmetro bioquímico. Podemos notar que há uma diferença anterior ao tratamento onde essa citocina é maior na linhagem isogênica. Com o tratamento houve uma diminuição de VEGF nos implantes de Balb/C e aumento nos implantes dos animais Swiss (Fig. 5).

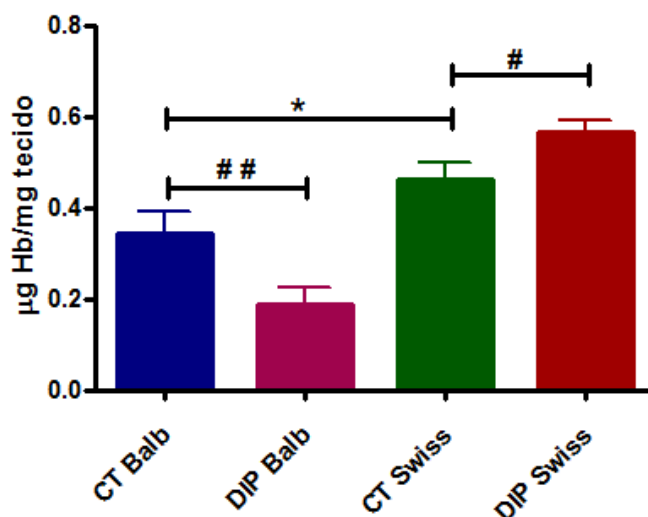


Figura 4 – Efeito do dipiridamol nos parâmetros angiogênicos em implantes de camundongos Balb/C e Swiss no conteúdo de hemoglobina intra-implante.

Diferenças nos parâmetros angiogênicos e respostas ao dipiridamol foram observadas entre as linhagens. Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. Diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C representada por * $p < 0,05$ e diferença significativa após o tratamento com DIP representada por # $p < 0,05$ (ANOVA).

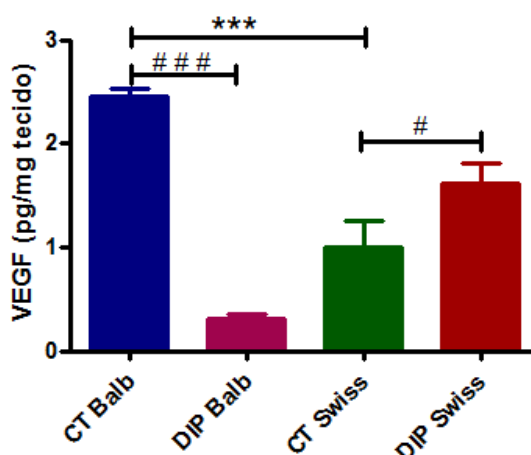


Figura 5 – Efeito do dipiridamol nos parâmetros angiogênicos em implantes de camundongos Balb/C e Swiss no conteúdo de VEGF intra-implante.

Diferenças nos parâmetros angiogênicos e respostas ao dipiridamol foram observadas entre as linhagens. Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. Diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C representada por * $p < 0,05$ e diferença significativa após o tratamento com DIP representada por # $p < 0,05$ (ANOVA).

A análise morfométrica do número de vasos sanguíneos intra-implante foi consistente com os dados bioquímicos que mostraram aumento no número de novos vasos em implantes Swiss comparado com os implantes Balb/C e refletem os efeitos opostos do tratamento com dipiridamol na neovascularização nas duas linhagens (Figura 6).

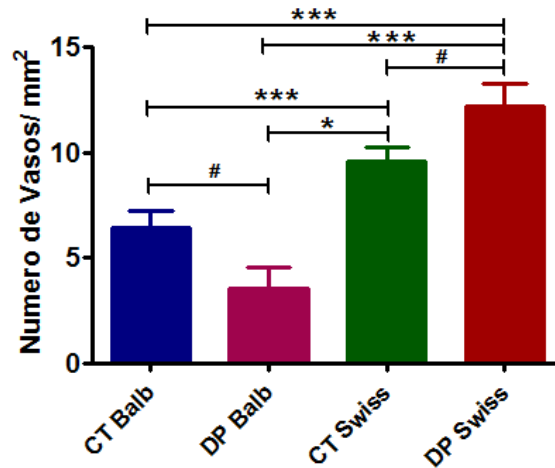


Figura 6 – Análise morfométrica do número de vasos sanguíneos intra-implante. Diferenças nos parâmetros angiogênicos e respostas ao dipiridamol foram observadas entre as linhagens. Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. Diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C é representada por * $p < 0,05$ e diferença significativa após o tratamento com DIP por # $p < 0,05$ (ANOVA).

4.2 – Parâmetros Inflamatórios

Os componentes da inflamação que foram induzidos pelo implante da esponja foram mensurados através de dosagens que correlacionam a atividade enzimática com a quantidade de células inflamatórias recrutadas e a concentração das citocinas inflamatórias como TNF- α e MCP-1. Podemos perceber uma diferença na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) entre as duas linhagens, mostrando que a linhagem Balb/C possui maior quantidade dessa enzima no grupo controle quando comparada com a linhagem Swiss. Após o tratamento por sete dias com dipiridamol ocorreu uma redução dos níveis de MPO nos implantes linhagem Balb/C, no entanto não houve diferença nos níveis desta enzima nos implantes dos animais Swiss após o tratamento (Fig. 7).

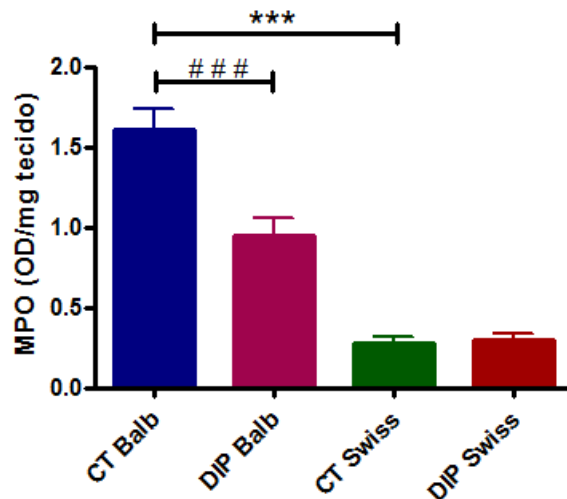


Figura 7 - Efeito do dipiridamol na atividade da enzima mieloperoxidase em implantes de animais Balb/C e Swiss.

Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. * $p < 0.05$ representa a diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C e # $p < 0,05$ representa a diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

Os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), potente citocina presente em processos inflamatórios, possui conteúdo similar nas esponjas controle das duas linhagens. Após sete dias de tratamento com dipiridamol os níveis de TNF-alfa são reduzidos em ambas linhagens (Fig. 8).

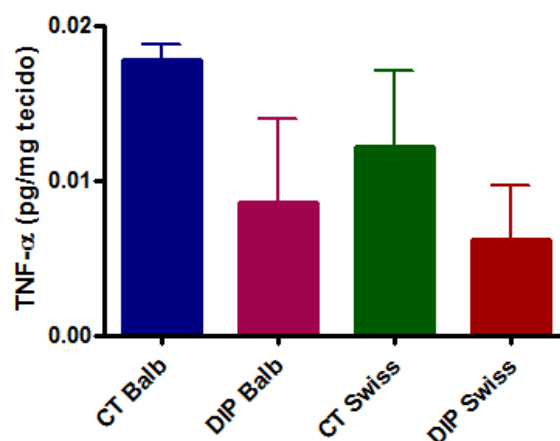


Figura 8 - Efeitos do dipiridamol na produção da citocina pró-inflamatória TNF- α .

Os níveis dessa citocina não variaram entre as linhagens. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo (ANOVA).

A atividade enzimática de N-acetil-glicosaminidase (NAG) que infere o recrutamento de macrófagos ativados é similar nas duas linhagens.

Há uma redução dos níveis de atividade dessa enzima após o tratamento com DIP apenas na linhagem Balb/C (Fig. 9). Os níveis de MCP-1, uma quimiocina responsável por atrair monócitos para o sítio inflamatório, foi maior em animais isogênicos. Após o tratamento não houve redução dos níveis da citocina nas duas linhagens (Fig. 10).

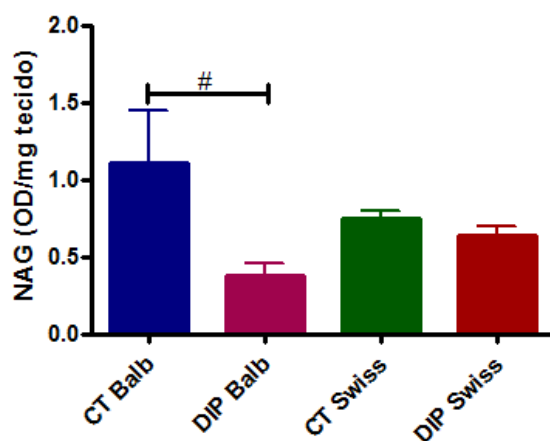


Figura 9 - Efeito do dipiridamol nos parâmetros inflamatórios nos implantes Balb/C e Swiss. Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. # $p < 0.05$ representa diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

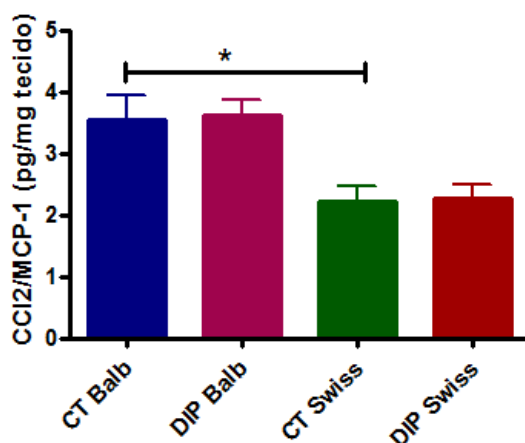


Figura 10 - Efeitos do dipiridamol na produção de citocina pró-inflamatória CCL2(MCP-1/JE). Os níveis dessa citocina foram maiores nos implantes Balb/C. Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. * $p < 0.05$ representa diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C (ANOVA)

A produção de nitrito (marcador indireto da produção de NO) é similar nos implantes do grupo controle nas duas linhagens. O tratamento com DIP foi capaz de aumentar os níveis de nitrito nos implantes da linhagem Balb/c (Figura 11).

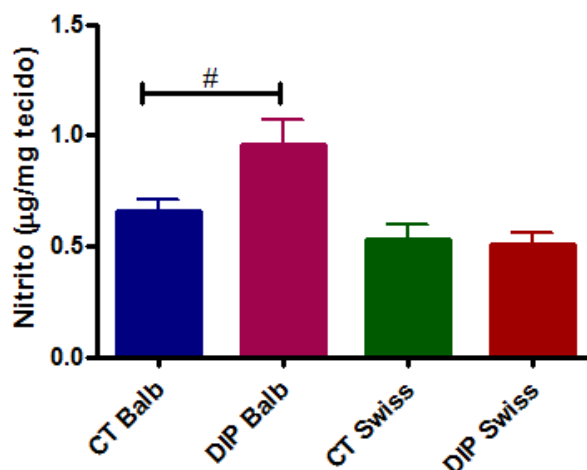


Figura 11 - Efeito do dipiridamol na produção de nitrito em implantes de camundongos Balb/C e Swiss.

Os valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. # $p < 0.05$ representa a diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

4.3 – Parâmetros Fibrogênicos

A mensuração da fibrose formada no sítio inflamatório pode ser determinada pelos níveis de colágeno e pela quantificação da citocina TGF- β contidos nos implantes. Nas esponjas do grupo controle há uma diferença nos níveis de colágeno entre as linhagens Balb/C e Swiss, onde a linhagem Swiss mostra níveis mais altos. Após sete dias de tratamento com dipiridamol ocorreu um aumento nos níveis de TGF na linhagem heterogênea, enquanto que a linhagem isogênea mostra uma redução. O conteúdo do colágeno foi avaliado através do método colorimétrico do picrossirius red (Fig. 12)

Quanto a citocina TGF-Beta1, nas esponjas do grupo controle, o gráfico mostra que há maior produção na linhagem isogênea e após o uso do dipiridamol, a citocina aumenta seus níveis em ambos os grupos (Fig. 13).

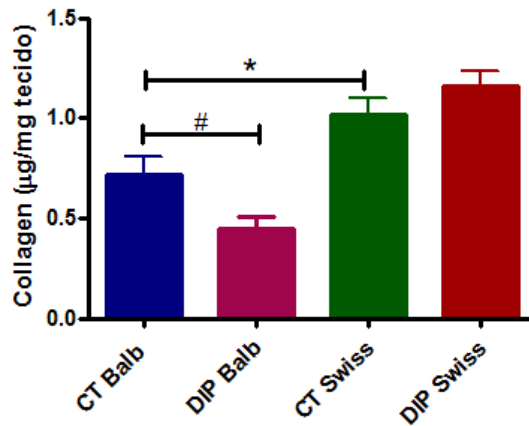


Figura 12 - Efeitos do dipiridamol na deposição de colágeno e nos níveis de TGFβ1 nos implantes de animais Balb/C e Swiss.

A deposição de colágeno variou entre as linhagens e o tratamento com dipiridamol exerceu atividade diferencial nas linhagens. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. * $p < 0.05$ representa a diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C. # $p < 0.05$ representa a diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

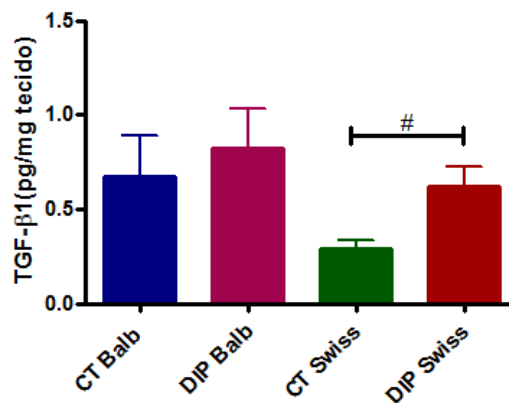


Figura 13 - Efeitos dos níveis de dipiridamol em TGFβ1 nos implantes Balb/C e Swiss.

O tratamento com dipiridamol mostrou sensibilidade relativa a linhagem. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 6-8 animais por cada grupo. # $p < 0.05$ representa a diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

4.4 – Difusão da Fluoresceína

Tendo estabelecido que o dipiridamol exerceu efeitos moduladores distintos nos componentes angiogênicos, inflamatórios e fibrogênicos do tecido fibrovascular, nós investigamos o efeito vasodilatador do composto no fluxo sanguíneo cutâneo das duas linhagens.

O método da difusão da fluoresceína permite a avaliação do fluxo sanguíneo intradérmico através da injeção de substância fluorescente no animal. O gráfico abaixo (Fig. 14) mostra os picos de fluorescência antes e após o tratamento com uma dose de dipiridamol (200mg/Kg) administrada 24h antes da avaliação. O fluxo sanguíneo cutâneo dos animais Swiss foi maior do que aquele dos Balb/c, uma vez que a linhagem heterogênea atinge o pico de fluorescência em menor tempo quando comparada a linhagem isogênica. Isso significa que o marcador se difundiu na corrente sanguínea da linhagem swiss mais rapidamente do que na linhagem Balb/c. Após o tratamento os picos de fluorescência foram reduzidos nas duas linhagens que significa um aumento da difusão do marcador (vasodilatação).

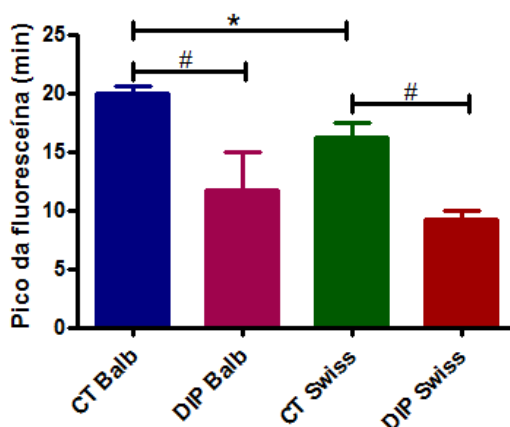


Figura 14 - Efeito do dipiridamol na difusão da fluoresceína após injeção intradérmica do corante em camundongos da linhagem Balb/C e Swiss.

Valores mostrados são as médias (\pm SEM) dos grupos de 4-6 animais por cada grupo. * $p < 0.05$ representa diferença significativa entre os implantes Swiss e Balb/C. # $p < 0.05$ representa diferença significativa após o tratamento com DIP (ANOVA).

4.5 – Avaliação da Histologia

Secções histológicas (coloração HE) dos implantes de esponja em duas linhagens diferentes de camundongos mostraram um estroma ocupando os poros de matriz sintética. Nos quadros A, B, C e D é possível ver vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos fusiformes em todos os cortes. Os quadros A e

B se referem a linhagem Balb/c controle e após tratamento com DIP, respectivamente. Já os quadros C e D se referem a linhagem Swiss, tratado e não tratado, respectivamente. Há mais vasos sanguíneos e deposição de colágeno nos implantes da linhagem Swiss. Além disso, o tratamento com dipiridamol foi capaz de reduzir a inflamação, angiogênese e deposição de colágeno em implantes da linhagem Balb/C, mas não na linhagem Swiss. Os quadros E e F se referem a uma secção da esponja da linhagem Swiss ligada ao anticorpo monoclonal CD31. Esse anticorpo se liga a células endoteliais e por isso é uma boa referencia para verificar a formação de novos vasos. Nesse caso, o quadro F que é uma ampliação do quadro E mostra a ligação do anticorpo a um dos vasos neoformado da linhagem Swiss. É possível visualizar na histologia um aumento do número de vasos na linhagem Swiss.

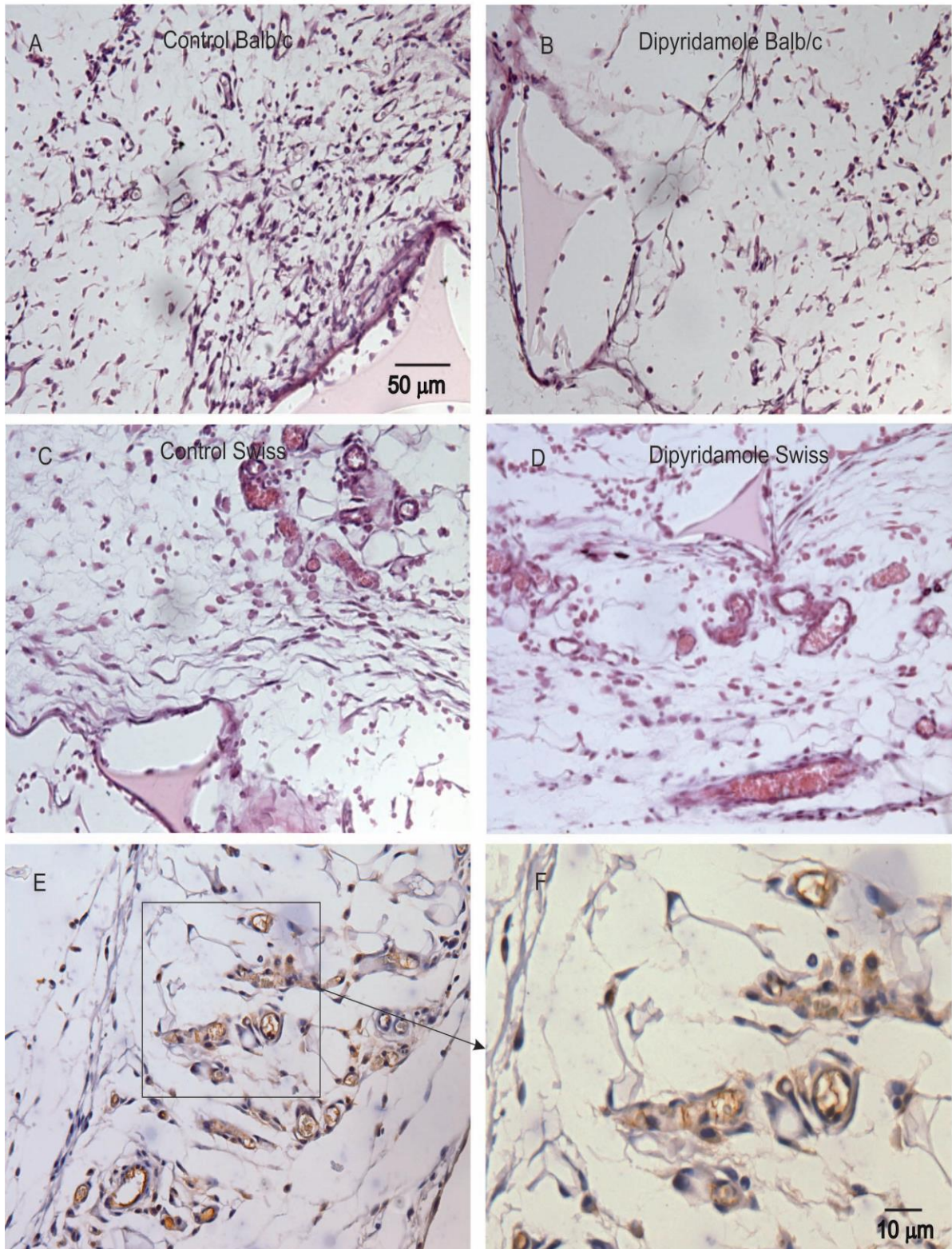


Figura 15 - Secções histológicas representativas em A, B, C e D (5µm, corado com H&E). As secções E e F foram ligadas ao anticorpo monoclonal CD31. Essas secções de tecido fibrovascular foram induzidas por implantes de esponja subcutâneos em camundongos Balb/C e Swiss.

O estroma fibrovascular que ocupa os poros da matriz esponjosa (formato triangular) é composto de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos fusiformes. O tecido nos implantes Swiss é mais vascularizado. O tratamento com DIP modificou o padrão de infiltração celular em implantes Balb/C, mas não em Swiss.; Aumento 400x; Inserção 1000x.

5 – Discussão

Esses experimentos demonstraram que a heterogeneidade genética influenciou tanto o desenvolvimento de componentes fibrovasculares induzidos por matriz sintética alojada no espaço subcutâneo de camundongos Swiss e Balb/c quanto a resposta dos animais ao dipiridamol. Esse composto já é utilizado na clínica há décadas em uma série de condições vasculares como insuficiência cardíaca, enfermidades tromboembólicas e claudicação intermitente e tem demonstrado exercer outras atividades biológicas importantes tais como: efeitos anti-inflamatórios, anti-fibrogênicos, anti-fosfodiesterásicos, anti-oxidante e anti-proliferativos¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Além disso, tem sido demonstrado que o dipiridamol aumenta a perfusão do tecido isquêmico, a angiogênese e a arteriogênese devido a sua habilidade de aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico¹¹¹. Evidências experimentais demonstram que o DIP possui ações terapêuticas que eleva sua importância como uma droga que pode ser reposicionada no mercado devido ao seu valor médico e comercial, ou seja, novas indicações para uma droga já existente e bastante conhecida não só pelos efeitos clássicos, como também pelos seus efeitos colaterais já bem estabelecidos. Nesse trabalho, nós identificamos novas propriedades desse composto, como seu efeito anti-inflamatório, anti-fibrogênico e suas ações angiogênicas, assim como a interação entre o background genético dos animais e os efeitos do DIP.

O modelo escolhido para investigar os efeitos do DIP na angiogênese inflamatória baseia-se no implante subcutâneo de esponja de poliéster-poliuretano no dorso de camundongos das linhagens Balb/C e Swiss. Já é bem documentado que a implantação de matrizes sintéticas induz a formação de um tecido fibrovascular cujos componentes (inflamação, angiogênese e fibrogênese)

são uma resposta necessária a injúria ⁹⁰. No entanto, em várias condições patológicas (processos inflamatórios crônicos, tumores) estes componentes são considerados responsáveis pela manutenção e agravamento dos processos. Utilizando-se este modelo foi possível detectar que os implantes do grupo controle de ambas as linhagens encontravam-se aderidos aos tecidos adjacentes sete dias pós-implantação. A intensidade da aderência foi maior nos animais Swiss em relação aos Balb/c, porém o tratamento atenuou o processo de aderência em ambas às linhagens. Além disso, o local onde a esponja estava inserida apresentava uma resposta inflamatória natural do tecido a um corpo estranho. Foi possível perceber que tanto os componentes do tecido fibrovascular como a sensibilidade dos animais são traços associados ao background genético. Por exemplo, os implantes dos animais Swiss eram inerentemente mais vascularizados do que os dos camundongos Balb/c. Além disso, o tratamento com o DIP exerceu efeito anti-angiogênico nos implantes de camundongos Balb/c e pró-angiogênico nos implantes de camundongos Swiss. É possível que esse efeito tenha ocorrido como mecanismo de compensação do VEGF ou por uma resposta a características inerentes de cada linhagem que não foram aprofundadas nesse estudo.

Vários estudos já mostraram vários fenótipos influenciados pelo background genético incluindo, tolerância ao etanol ⁹⁷, sepse ⁹⁸, secreção de insulina ³, cicatrização óssea ⁹⁹, de feridas de vários tecidos ¹⁰⁰⁻¹⁰², susceptibilidade à glomerulonefrite autoimune ¹⁰³, resposta ao treinamento físico ¹⁰⁴. Alguns estudos têm identificado também a influência da heterogeneidade genética na angiogênese e processos associados. Foi observado que camundongos FVB que tem uma resposta angiogênica menos intensa do que camundongos C57BL/6J

são mais resistentes ao crescimento de retinoblastomas ⁴. Rohan et al., (2000) avaliaram a sensibilidade de diferentes linhagens de camundongos isogênicos a fatores angiogênicos utilizando o modelo de neovascularização da córnea. O estudo revelou que camundongos FVB apresentaram moderada angiogênese em relação aos camundongos da linhagem C57BL/6J. Além disso, foi observado que o background genético alterou a sensibilidade das linhagens a inibidores angiogênicos ⁵. Ward et al., 2007, mostrou também que fatores angiogênicos cerebrais, como VEGF, angiopoietinas e Tie 2, e a resposta fisiológica à hipóxia crônica diferiam entre linhagens de camundongos comumente utilizadas, como CD1, 129/SV, C57BL/6 e Balb/c. ⁶. Mais recentemente, Marques et al. 2011 ao caracterizar a cinética da formação do tecido fibrovascular induzido por implantes de esponjas em camundongos isogênicos e heterogênicos revelou diferenças marcantes na intensidade da angiogênese ⁷. Dessa forma, diversos estudos tem mostrado que a heterogeneidade genética desempenha um papel importante na resposta angiogênica e esse fator deve ser considerado no desenho experimental e interpretação dos resultados de acordo com a linhagem utilizada.

O efeito angiogênico do dipiridamol em implantes Swiss estão de acordo com os resultados de Patillo *et al.* que demonstraram o efeito pró-angiogênico na isquemia de membro inferior, porém ele contrasta com o efeito anti-angiogênico em camundongos Balb/C ¹¹¹. Esse achado demonstra a importância de conhecer a sensibilidade de diferentes linhagens de animais a fármacos com atividade angiogênica.

Outro resultado inesperado no trabalho tem foi nos níveis de VEGF intra-implante, uma citocina marcadora da angiogênese, foi menor em camundongos

Swiss comparado aos implantes de Balb/C. No entanto, o tratamento com DIP estimulou a produção de VEGF em implantes de Swiss.

Esses resultados indicam que o background genético influenciou não só a produção de citocina do grupo controle, como também sua produção em resposta ao fármaco.

O fato dos níveis de VEGF serem maiores em implantes menos vascularizados (animais isogênicos) pode indicar uma tentativa de compensação para a deficiência vascular dessa linhagem. O VEGF é produzido por células endoteliais quiescentes em uma ação autócrina de proteção. Essas células possuem sensores de oxigênio e um exemplo da produção de VEGF é no caso de hipóxia, quando os sensores serão ativados e essa produção ocorrerá para ajustar a demanda²⁴. O achado do estudo é pertinente com os dados apresentados por Fukino *et al*, 2003 que demonstraram deficiência na formação de vasos colaterais em camundongos Balb/C comparados a uma outra linhagem isogênica (C57Bl/6)¹¹². Nossa análise morfométrica de implantes de animais tratados e não tratados corrobora com parâmetros bioquímicos usados como evidência indireta da angiogênese.

Em relação aos parâmetros inflamatórios também podemos perceber uma nítida diferença entre as linhagens e em resposta ao fármaco. A resposta inflamatória aguda pode ser avaliada por meio da mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da citocina TNF- α . O MPO é um marcador do recrutamento de neutrófilos¹¹³. Em níveis controle ele já se mostra seis vezes maior na linhagem isogênica em comparação aos implantes Swiss. O tratamento com dipiridamol reduziu os níveis da atividade de MPO. A citocina pró-inflamatória TNF- α não mostrou alterações significativas antes ou depois do

tratamento ou até mesmo entre linhagens. Para avaliar os parâmetros inflamatórios crônicos mensuramos a atividade da N-acetil-glicosaminidase (NAG), um marcador para o recrutamento de macrófagos e é também encontrado nos lisossomos de monócitos, e a citocina MCP-1/CCL2 uma quimiocina que recruta macrófagos ¹¹⁴. Houve maior produção de NAG e MCP-1/CCL2 na linhagem isogênica em comparação à linhagem heterogênica e após o tratamento com DIP os níveis de NAG foram reduzidos na linhagem isogênica, entretanto o tratamento foi ineficaz em produzir efeito nos parâmetros inflamatórios crônicos na linhagem heterogênica. Pela diminuição dos níveis das enzimas inflamatórias após o tratamento com dipiridamol em Balb/C podemos confirmar os efeitos anti-inflamatórios descrito em outros animais ¹⁰⁹ e ressaltar a diferença entre as linhagens uma vez que os implantes Swiss não foram afetados pelo tratamento.

O tratamento com dipiridamol também provocou um aumento na produção de nitrito (avaliação indireta da produção de NO). O NO é uma molécula que pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio onde se encontra e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato. O NO é citotóxico e vasodilatador além de modular reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo ¹¹⁵. O NO medeia vários fenômenos como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária ^{116,117}. Esta molécula permite a produção de GMPc que é um dos responsáveis pela vasodilatação. O dipiridamol age inibindo a fosfodiesterase responsável por clivar o GMPc causando dessa forma seu aumento e com isso seu efeito vasodilatador. Considerando que a maior disponibilidade do NO na linhagem isogênica, assim como seus efeitos vasodilatador e citotóxico, podemos inferir

que o DIP tenha agido por esse mecanismo contribuindo para a redução da inflamação nos implantes dos camundongos Balb/c.

Em nosso estudo o aumento de nitrito intra-implante na linhagem isogênica após o tratamento com DIP concorda com os achados de Patillo *et al*, 2010 que mostra um aumento dos níveis de NO/nitrito em musculatura isquêmica de camundongos C57Bl/6J (linhagem isogênica) após tratamento com DIP ¹¹¹. Nossos resultados mostraram que a linhagem isogênica apresenta resposta inflamatória mais exacerbada ao implante e maior sensibilidade ao dipiridamol enquanto que a linhagem heterogênea foi menos sensível a droga como também na resposta inflamatória basal.

Com relação a resposta fibrogênica avaliada pela deposição de colágeno e níveis de produção da citocina TGF- β 1 as linhagens obtiveram respostas divergentes. A linhagem heterogênica apresentou uma maior deposição de colágeno em relação a linhagem isogênica e após o tratamento com dipiridamol, os níveis do colágeno da linhagem isogênica foram reduzidos. Em contraste, o mesmo tratamento não promoveu alteração na deposição do colágeno na linhagem heterogênica. Em relação à produção da citocina TGF- β 1, o DIP foi eficaz em aumentar seus níveis nos implantes dos animais heterogênicos. Nos animais isogênicos, embora os níveis de TGF- β 1 tenham sido maiores, não houve aumento correspondente do colágeno. Essas diferenças nas ações exercidas pelo dipiridamol, na deposição de colágeno e produção da citocina podem ser atribuídas ao background genético de cada linhagem. Os achados de Kolb *et al* 2002 corroboram com nossos estudos quando mostram que camundongos Balb/C foram mais resistentes à fibrose pulmonar induzida por

vários componentes comparado com camundongos C57BL6/J sugerindo dessa forma que essa diferença se deve a heterogeneidade genética ¹¹⁸.

Após determinarmos diferenças entre os vários componentes do tecido fibrovascular recém-formado nas duas linhagens e sensibilidade diferencial ao DIP foi avaliada a possibilidade da existência de diferenças entre a vasculatura pré-existente da pele. A avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo utilizando o método da difusão da fluoresceína ⁹⁰ revelou que nos camundongos Balb/c a difusão da fluoresceína ocorria mais tardiamente em relação ao Swiss, uma diferença funcional inerente destes animais. No entanto, ambos os animais responderam de forma similar ao fármaco.

Os resultados desta investigação mostraram a influência do background genético em promover marcante heterogeneidade nos componentes da angiogênese inflamatória e na sensibilidade diferencial ao DIP podendo ser relevantes em direcionar a escolha de animais experimentais ou a população humana em testes clínicos de drogas com atividade nestes processos.

<i>Resposta das linhagens ao DIP</i>	<i>Balb/C</i>	<i>Swiss</i>
Vascularização	Redução	Aumento
Inflamação	Redução	Não há diferença significativa
Fibrose	Redução	Aumento

Figura 16: Tabela

6 - Conclusões

1- As linhagens Swiss e Balb/c respondem diferentemente ao implante e ao tratamento com DIP.

2- Tratamento com DIP gera aumento da angiogenese na linhagem Swiss e redução na linhagem Balb/c por razões ainda pouco claras.

3- O DIP diminui a atividade pró-inflamatória de células no modelo realizado em Balb/c e não teve influencia na linhagem Swiss.

4-Esse estudo revela novos efeitos potenciais do DIP na angiogênese inflamatória (reposicionamento de drogas).

5- Fatores genéticos determinam a capacidade fibroproliferativa dos animais bem como a resposta a fármacos que atuam no processo.

7 - Referências Bibliográficas

- 1- JHONSON, K.R.; ZHENG, Q.Y.; NOBEN-TRAUTH, K. **Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice.** *Brain Res.*, v. 1091, n. 1, p. 79-88, 2006.
- 2- SIGMUND, CD. **View point: Are studies in genetically altered mice out of control?** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , n. 20:1425-1429, 2000.
- 3- ANDRIKOPOULOS, S.; MASSA, C.M.; ASTON-MOURNEY, K.; FUNKAT, A.; FAM, B.C.; HULL, R.L.; KHAN, S.E.; PROIETTO, J. **Differential effect of inbred mouse strain (C57Bl/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet.** *J. Endoc*, 187:45-53, 2005.
- 4- GRIEP, AE; KRAWCEK, J; LEE, D; LIEM, A; ALBERT, DM; CARABEO, R; DRINKWATER, N; MCCALL, M; SATTLER, C; LASUDRY, JG; LAMBERT, PF. **Multiple genetic loci modify risk for retinoblastoma in transgenic mice.** *Invest Ophthalmol Visc Sci.*, 39(13):2723-2732, 1998
- 5- ROHAN, RM; FERNANDEZ, A; UDAGAWA, T; YUAN J; D'AMATO, RJ. **Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice.** *Faseb Journal*, 14:871-876, 2000.
- 6- WARD, NL; MOORE, E; NOON, K; SPASSIL, N; KEENAM, E; IVANCO, TL; LAMANNA, JC. **Cerebral angiogenic factors, angiogenesis and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains.** *J Appl Physiol.*, 102(5): 1927-1935; 2007.

- 7- MARQUES SM; CAMPOS PP; CASTRO PR; CARDOSO CC; FERREIRA MA; ANDRADE SP. **Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis.** *Microvasc Resp.*, 82(3):246-252, 2011.
- 8- GREGOR, Z; JOFFE, L. **Senile Macular changes in the black African.** *Br J Ophthalmol.*, 62(8):547-550; 1978
- 9- LIBBY, P. **Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease.** *Nutr. Rev.*, v. 65, n. 12 Pt 2, p. S140-S146, 2007.
- 10- BENELLI, R.; LORUSSO, G.; ALBINI, A.; NOONAN, D.M. **Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, n. 24, p. 3101-3115, 2006.
- 11-CHARO, I.F.& RANSOHOFF, R.M. **The many roles of chemokines and Chemokine receptors in inflammation.** *N. Engl. J. Med.*, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.
- 12- CHARO, I.F. & TAUBMAN, M.B. **Chemokines in the pathogenesis of vascular disease.** *Circ. Res.*, v. 95, n. 9, p. 858-866, 2004.
- 13- FILHO, G.B. **Inflamações.** In: *Bogliolo Patologia.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, 7^a edição, p. 130-174.
- 14- COUSSERS, L. & WERB, Z. **Inflammation and Cancer.** *Nat.*, v. 420, n. 6927, p. 860-867, 2002.
- 15- NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** *Nature*, v. 420 n. 6917, p. 846-852, 2002.

- 16- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Inflamação aguda e crônica.** In: ROBBINS. *Patologia Básica.* 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2008, p. 33-62.
- 17-VISSER, K.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. **Paradoxical roles of the immune system during cancer development.** *Nat. Rev. Cancer*, v.6, n.1, p. 24-37, 2006.
- 18- TRACEY, K.J. **The inflammatory reflex.** *Nature*, v.420, n. 6927, p. 853-859, 2002.
- 19- MROWIETZ, U. & BOEHNCKE, W.H. **Leukocyte adhesion: a suitable target for anti-inflammatory drugs.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, n. 22, p. 2825-2831, 2006.
- 20-POTENTE, M.; GERHARDT, H; CARMELIET, P. **Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.** *Cell.* V. 146, n. 6, p. 873-87, 2011.
- 21-RISSAU, W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature*, v. 386, p. 671-674, 1997.
- 22-STATON, C. A.; LEWIS, C.; BICKNELL, R. **Angiogenesis Assays: a critical appraisal of current techniques.** *Wiley*, 2007.
- 23-RAJOTTE, E.; ARAP, W.; HAGEDORN, M.; KOIVUNEN, E.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. **Molecular heterogeneity of vascular endothelium revealed by in vivo phage display.** *J.Clin. Invest.*, v.102, n. 2, p. 430-437, 1998.
- 24-CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. **Molecular mechanisms of blood vessel growth.** *Cardiovasc. Res.*, v. 49, n. 3, p. 507-521, 2001.

- 25- DULAK, J. & JOZKOWICZ, A. **Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy.** *Curr. Cancer Drugs Targets*, v. 5, n. 8, p. 579-594, 2005.
- 26- AREMBERG, D.A.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; SHANAFELT, A.; STRIETER, R.M. **In vitro and in vivo systems to assess role of CXC chemokines in regulation of angiogenesis.** *Methods Enzymol.*, v. 288, p. 190-220, 1997.
- 27-INGBER, D.E.; MADRI, J.A.; FOLKMAN, J. **A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution.** *Endocrinology*, v. 119, n. 4, p. 1768-75, 1986.
- 28-D'AMORE, P.A. & THOMPSON, R. **Mechanisms of angiogenesis.** *Ann. Rev. Physiol.*, v. 49, p. 453-464, 1987.
- 29- CHANG, C. & WERB, Z. **The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.** *Trends in Cell. Biol.*, v. 11, n. 11, p. S37-S43, 2001.
- 30-FOLKMAN, J. **Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease.** *Nat. Med.*, v. 1, n.1, p. 27-31, 1995.
- 31-MADRI, J.A. & WILLIAMS, S.K. **Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components.** *J. Cell. Biol.* V. 97, n. 1, p. 153-165, 1983.
- 32- FOLKMAN, J.; KLASGEBRUN, M.; SASSE, J.; WADZINSKI, M.; INGBER, D.; VLODAVSKY, I.A **heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor is stored in the basement membrane.** *Am. J. Pathol.*, v. 130, n. 2, p. 393-400, 1988.

- 33-DAVIDSON, J.M. & BENN, S.I. **Regulation of angiogenesis and wound repair: Interactive role of the matrix and growth factors.** In: *SIRICA, A.E. Cellular and molecular pathogenesis.* USA: Lippincott-Raven publishers, 1996, p. 79-107.
- 34- CARMELIET, P. **Blood vessels and nerves: common signals, pathways and disease.** *Nature*, v. 4, n. 9, p. 710-20, 2003
- 35- FOLKMAN, J. **Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery?** *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.6, n. 4, p. 273-86, 2007.
- 36-FOLKMAN, J. & BREM, H. **Angiogenesis and inflammation.** In **J.I. Gallin I.M. Golstein and R. Snyderman.** *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* 2^a ed. Raven Press, Ltd., New York, 1992, p. 821-839.
- 37- AUSPRUNK, D.H. & FOLKMAN, J. **Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.** *Microvasc. Res.*, v. 14, n. 1, p. 53-65, 1977.
- 38- OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.R.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDINE, A.I. **Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms.** *Blood Cells Mol. Dis.*, v. 39, n. 2, p. 212-220, 2007.
- 39-FOLKMAN, J. & GREESPAN, H.P. **Influence of geometry on control of cell growth.** *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 417, n. 3-4, p. 211-231, 1975.
- 40-GREENHALGH, D.V. **The role of growth factors in wound healing.** *J. Traum.*, v. 41, n. 1, p. 159-167, 1996.

- 41- FOLKMAN, J. & KLAGSBRUN, M., **Angiogenic factors**. *Sci.*, v. 235, n. 4787, p. 442-447, 1987.
- 42-CARMELIET, P. & JAIN, R.K. **Angiogenesis in cancer and other diseases**. *Nat.*, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.
- 43-YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W.; **Vascular-specific growth factor and blood vessel formation**. *Nature*, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.
- 44-PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R; RUSNATI, M. **Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis**. *Cytok. Growth Factor Rev.*, v. 16, n. 2, p. 159-178, 2005.
- 45- MIYAZONO, K.; USUKI, K.; HELDIN, C.H. **Platelet-derived endothelial cell growth factor**. *Prog. Growth Factor Res.*, v.3, n.3, p. 207-217, 1991.
- 46-ONISHI, T. & DAIKUHARA, Y. **Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues**. *Arch. Oral Biol.*, v. 48, n.12, p. 797-804, 2003.
- 47-LUTTUN, A.; TJWA, M.; CARMELIET, P. **Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders**. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 979, p. 80-93, 2002.
- 48-FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LEUCOTER, J. **The biology of VEGF and its receptors**. *Nat. Med.*, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003
- 49- WHEELER-JONES, C.; ABU-GHAZALEH, R.; COSPEDAL, R.; HOULISTON, R.A.; MARTIN, J.; ZACHARY, I. **Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of**

- cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase.** *FEBS Lett.*, v. 420, n. 1, p. 28-32, 1997.
- 50-GERBER, H.P.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B.A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. **Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.** *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 46, p. 30336-3-30343, 1998a.
- 51-GERBER, H.P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. **Vascular endothelial growth factor induced expression. Of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.** *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 21, p. 13313-13316, 1998b.
- 52-ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M.; **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO J.*, v. 18, n. 14, p. 3964-3972, 1999.
- 53-COSTA, C.; SOARES, R.; SCHMITT, F. **Angiogenesis: now and then.** *APMIS.*, v. 112, n. 7-8, p. 402-412, 2004.
- 54- COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. **Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?** *Angiogenesis.*, v. 10, n. 3, p. 149-166, 2007.
- 55-DISTLER, J.W.; HIRTH, A.; KUROWSKA-STOLARRSKA, M.; GAY, S.; DISTLER, O. **Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.** *Q. J. Nucl. Med.*, v. 47, n. 3, p. 149-161, 2003.

- 56-MOSES, M.A. **The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors.** *Stem Cells (Dayton Ohio)*, v. 15, n. 3, p. 180-189, 1997.
- 57-MIGNATTI, P. & RIFKIN, D.B. **Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis.** *Enzyme & Protein.*, v. 49, n. 1-3, p. 117-137, 1996.
- 58-MURPHY, G.; KNAUPER, V.; COWELL, S.; HEMBRY, R.; STANTON, H.; BUTLER, G.; FREIJE, J.; PENDAS, A.M.; LOPEZ-OTIN, C. **Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.** *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 878, p. 25-39, 1999.
- 59-HIRSCHI, K.K. & D'AMORE, P.A. **Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance.** *EXS.*, v. 79, p. 419-428, 1997.
- 60-JAIN, R.H. **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nat. Med.*, v. 9, n. 6, p. 685-693, 2003.
- 61-JACKSON, J.R.; BOLOGNESE, B.; KIRCHER, C.H.; MARSHALL, L.A.; WINKLER, J.D. **Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation.** *Inflamm. Res.*, v. 46, n. 2, Suppl, p. S129-30, 1997.
- 62-NALDINI, A. & CARRARO, F. **Role of inflammatory mediators in angiogenesis.** *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy*, v. 4, n.1, p. 3-8, 2005.
- 63-LEY, K., **Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants.** *Immunol. Res.*, v. 24, n. 1, p. 87-95, 2001.

- 64-LAZARUS, G.S.; COOPER, D. M.; KNIGHTON, D.R.; MARGOLIS, D.J.; PECORARO, R.E.; RODEHEAVER, G.; ROBSON, M.C.; **Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing.** *Arch. Dermatol.* V. 130, n. 4, p. 489-493, 1994.
- 65-VAN ZUIJLEN, P.P.; ANGELES, A.P.; KREIS, R.W.; BOS, K.E.; MIDDELKOOP, E. **Scar assessment tools: implications for current research.** *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 109, n. 3, p. 1108-1022, 2002.
- 66-BOCK, O. & MROWIETZ, U. **Keloids: A fibroproliferative disorder of unknown etiology.** *Hautarzt.*, v. 53, n. 8, p. 515-523, 2002.
- 67-RAHBAN, S.R. & GARNER, W.L. **Fibroproliferative scars.** *Clin. Plast. Surg.*, v. 30, n. 1, p. 77-89, 2003.
- 68-KRUMMEL, T.M.; NELSON, J.M.; DIEGELMANN, R.F.; **Fetal response to injury in the rabbit.** *J. Pediatr. Surg.*, v. 22, n. 7, p. 640-644, 1987.
- 69-DIELGELMANN, R.F. & EVANS, M.C. **wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.** *Front. Biosci.*, v. 9, p. 283-289, 2004.
- 70-ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. **Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta).** *Growth Factors*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 1993.
- 71-HALL, M.C.; YOUNG, D.A.; WATTERS, J.G.; ROWAN, A.D.; CHANTRY, A.; EDWARDS, D.R.; CLARK, I.M. **The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1.** *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 12, p. 10304-10313, 2003.

- 72-REGAN, M.C.; KIRK, S.J.; WASSERKRUG, H.L.; BARBUL, A. **The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype.** *J. Surg. Res.*, v. 50, n. 5, p. 442-448, 1991.
- 73-EHRLICH, H.P. & KRUMMEL, T.M. **Regulation of wound healing from a connective tissue perspective.** *Wound Repair Regen.*, v. 4, n. 2, p. 203-210, 1996.
- 74-CLARK, R.A. **Fibrin and wound healing.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 936, p. 355-367, 2001.
- 75-TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.
- 76- HINZ, B. **Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.** *J. Invest. Dermatol.*, v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.
- 77-WITTE, M.B. & BARBUL, A. **General principles of wound healing.** *Surg. Clin. North. Am.*, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.
- 78-DIEGELMANN, R.F. **Analisis of collagen Synthesis.** *Meth. Mol. Med.*, v. 78, p. 349-358, 2003.
- 79-DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** *Am. J. Pathol.*, v. 146, n.1, p. 56-66, 1995.
- 80-DUFFIELD, J.S. **The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde.** *Clin. Sci.(Lond).*, v. 104, n. 1, p. 27-38, 2003.
- 81- HUNT, T.K.; KNIGHTON, D.R.; THAKRAL, K.K.; GOODSON, W.H.; ANDREWS, W.S. **Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident**

- and activated wound macrophages.** *Surgery*, v. 96, n.1, p. 48-54, 1984.
- 82-LAVAN F.B. & HUNT, T.K. **Oxygen and wound healing.** *Clin. Plast. Surg.*, v. 17, n. 3, p. 463-472, 1990.
- 83- TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R.A. **Angiogenesis in wound healing.** *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, v. 5, n. 1, p. 40-46, 2000.
- 84-NISSEN, N.N.; POLVERINI, P.J.; KOCH, A.E.; VOLIN, M.V.; GAMELLI, R.L.; DIPIETTO, L.A. **Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.** *Am. J. Pathol.*, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, 1998.
- 85-MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. **Mechanisms of tissue repair: From wound healing to fibrosis.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.
- 86-KIM, H.H.; LIAO J.K. **Translational therapeutics of dipyridamole.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(3):39-42; 2008
- 87-GAMBOA, A; ABRAHAM, R; DIEDRICH, A; SHIBAO, C; PARANJAPE, SY; FARLEY, G; BIAGGIONI, I. **Role of adenosine and nitric oxide on the mechanisms of action of dipyridamole.** *Stroke.* 36(10): 2170-2175, 2005.
- 88- HUNG, KY; SHYU, RS; FANG, CC; TSAI, CC; LEE, PH; TSAI, TJ; HSIEH, BS. **Dipyridamole inhibits human peritoneal mesothelial cell proliferation in vitro and attenuates rat peritoneal fibrosis in vivo.** *Kidney International.* 59:2316-2324; 2001

- 89-GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. **Plastic sponge wich acts as a framework for living tissue.** *AMA Arch. Surg.*, v. 63, n. 3, p. 288-297, 1951.
- 90-ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. **Quantitative *in-vivo* studies on angiogenesis in a rat sponge model.** *Br. J. Exp. Path.*, v. 68, n. 6, p. 755-766, 1987.
- 91- BAILEY, P.J. **Spounge implants as models.** *Meth. Enzym.* 162: 327-334, 1998.
- 92-PLUNKETT, M.L. & HAILEY, J.A. **An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate.** *Lab. Invest.*, v. 62, n. 4, p. 510-517, 1990.
- 93- PASSANITI, A; TAYLOR, RM; PILI, R.; GUO Y.; LONG, P.V.; HANEY, J.A.; PAULY, R.R.; GRANT, D.S.; MARTIN, G.R. **A simple quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenesis agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor.** *Lab. Invest.*, 67: 519-28, 1992.
- 94- HU, D.E.; HILEY, C.R.; SMITHER, R.L.; GRESHAM, G.A.; FAN, T.P. **Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers.** *Lab. Invest.*, v. 72, n. 5, p. 601-10, 1995.
- 95- FERREIRA MAND; BARCELOS LS; CAMPOS PP; VASCONCELOS AC; TEIXEIRA MM; ANDRADE SP. **Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO).** *Br J Pharmacol.*, 141:1185-1192, 2004.

- 96- BELO, AV; LELES, F; BARCELOS, LS; FERREIRA, MA, BARKHLE, YS; TEIXEIRA, MM; ANDRADE, SP. **Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue.** *Microcirculation*, 12(7):597-606, 2005.
- 97-LINSENBARDT DN, MOORE EM, GROSS CD, GOLDFARB KJ, BLACKMAN LC, BOEHM SL 2nd. **Sensitivity and tolerance to the hypnotic and ataxic effects of ethanol in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice.** *Alcohol Clin Exp Res.* 2009; 33(3):464-476
- 98- ZHANG G, WANG J, KELLY J, GU G, HOU J, ZHOU Y, REDMONT HP, WANG JH, ZHANG X. **B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis.** *J. Immunol.* 2010; 185(6): 3677-84
- 99-MANIGRASSO MB, O'CONNOR JP. **Comparison of fracture healing among different inbred mouse strains.** *Calcif Tissue Int.* 2008;8:465-474
- 100- MANSINDE GL, LI R, NGUYEN B, YU H, SRIVASTAVA AK, EDDERKAUOI B, WERGEDAL JE, BAYLINK BJ, MOHAN S. **New quantitative trait loci that regulate wound healing in na intercross progeny from DBA/1J and 129x1SvJ inbred strains of mice.** *Funct Integr Genomics.*2006;6:157-163
- 101- PAL-GOSH S, TADVALKAR G, JURJUS RA, ZIESKE ID, STEPP MA. **BALB/C and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds.** *Exp Eye Res.* 2008;87:478-486.

- 102- UENO M, LYONS BL, BURZENSKI LM, GOTT B, SHAFFER DJ, ROOPENIAN DC, SHULTZ LD. **Accelerated wound healing of alkali-burned corneas in MRL mice is associated with a reduced inflammatory signature.** *IOVS.* 2005;46(11):4097-410
- 103- REYNOLDS J, ALBOULAINAIN A, DUDA MA, EVANS DJ, PUSEY CD. **Strain susceptibility to active induction and passive transfer of experimental autoimmuneglomerulonephritis in the rat.** *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21(12): 3398-408.
- 104- MASSETT MP, BERK BC. **Strain-dependent differences in responses in exercise training in inbred and hybrid mice.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005; 288(4):1006-13.
- 105- BARCELOS, LS; TALVANI, A; TEIXEIRA, AS; VIEIRA, LQ; CASSALI, GD; ANDRADE, SP; TEIXEIRA, MM. **Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1.** *J Leukoc Biol.*, 78(2):352-358, 2005.
- 106- BELO, AV; BARCELOS, LS; TEIXEIRA, MM; FERREIRA, MA; ANDRADE, SP. **Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice.** *Cancer Invest.*, 22(5):723-729; 2004.
- 107- IIMURA, O; KUSANO, E; AMEMYA, M; MUTO, S; IKEDA, U; SHIMADA, K; ASANO, y. **Dipyridamole enhances interleukin-1beta-stimulated nitric oxide production by cultured rat vascular smooth muscle cells.** *Eur J Pharmacol.*;296(3):319-326; 1996.
- 108- HILLIS, GS; DUTHIE, LA; MACLEOD, AM. **Dipyridamole inhibits human mesangial cell proliferation.** *Nephron.*; 78(2):172-178; 1998

- 109- WEYRICH, AS; DENIS, MM; KUHLMANN-EYRE, JR; SPENCER, ED; DIXON, DA; MARATHE, GK; MCINTYRE, TM; ZIMMERMANN, GA; PRESCOTT, SM. **Dypiridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates.** *Circulation.*, 111(5):633-642, 2005.
- 110- VENKATESH, PK; PATTILLO, CB; BRANCH, B; HOOD, J; THOMA, S; ILLUM, S; PARDUE, S; TENG, X; PATEL, RP; KEVIL, CG. **Dypiridamole enhances ischaemia-induced arteriogenesis through an endocrine nitrite/ nitric oxide-dependent pathway.** *Cardiovasc Res.*, 85(4):661-670, 2010.
- 111- PATILO, CB; BIR, SC; BRANCH, BG; GREBER, E; SHEN, X; PARDUE, S; PATEL, RP; KEVIL, CG. **Dypiridamole reverses peripheral ischemia and induces angiogenesis in the Db/Db diabetic mouse hind-limb model by decreasing oxidative stress.** *Free Radical Biological & Medicine*, 50:262-269, 2011.
- 112- FUKINO, K; SATA, M; SEKO, Y; HIRATA, Y; NAGAI, R. **Genetic Background influences therapeutic effectiveness of VEGF.** *Biochem and Biophysol research commun.*, 310:143-147, 2003.
- 113- BRECKWOLDT, MO; CHEN, JW; STANGENBERG, L; AIKAWA E; RODRIGUEZ, E; QIU S, MOSKOWITZ, MA; WEISSLEDER, R. **Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase.** *PNAS*, v. 105, n. 47, 2008.
- 114- SHALLO, H; PLACKETT, TP, HEINRICH, SA; KOVACS, EJ. **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage**

- infiltration into the skin after burn injury in aged mice.** *Burns*, v. 29, n. 7, 2003.
- 115- ADAMS, HR. **Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 209, n. 7, p. 1297-302, 1996.
- 116- KIECHELE, FL; MALINSKI, T. **Nitric oxide, biochemistry, pathophysiology and detection.** *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 100, n. 5, p. 567-75, 1993.
- 117- BARRACHINA, M.D.; PANÉS, J.; ESPLUGUES, J.V. **Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases; perspective for drugs development.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 7, n. 1, p. 31-48, 2001.
- 118- KOLB, M; BONNIAUD, P; GALT, T; SIME, PJ; KELLY, MM; MARGETTS, PJ; GAULDIE, J. **Differences in fibrogenic responses after transfer of active transforming growth factor- β 1 gene to lungs of “fibrosis-prone” and “fibrosis-resistant” mouse strains.** *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 27:141-150, 2002.

Figura 1 – Assay of angiogenesis – site: [www. amplab.de/angiogenesis](http://www.amplab.de/angiogenesis)

8 - Anexo