

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANGIOGÊNESE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NA ANGIOGÊNESE
EM MODELO DE IMPLANTE DE ESPONJA

ALUNA: Simone Aparecida de Almeida

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade

BELO HORIZONTE

2014

SIMONE APARECIDA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NA ANGIOGÊNESE
EM MODELO DE IMPLANTE DE ESPONJA**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

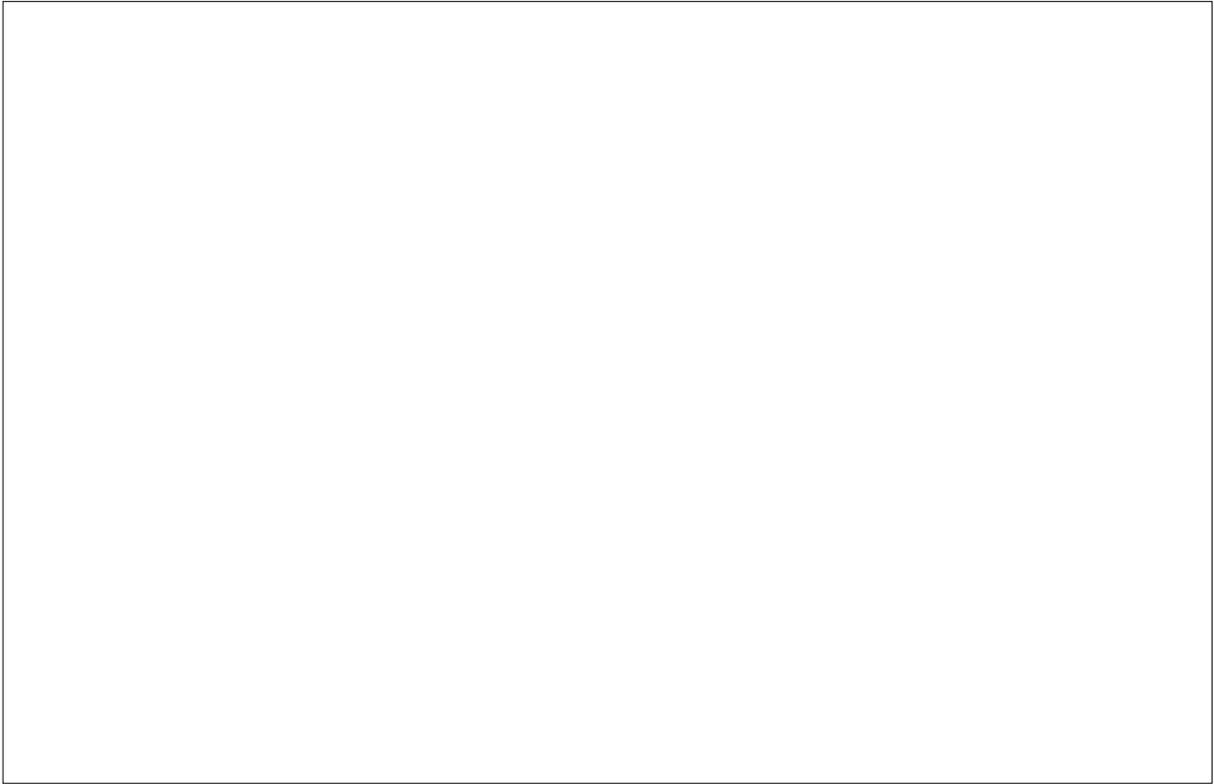
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BELO HORIZONTE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Sandra Goulart Almeida

Pró-Reitoria de Pós Graduação

Pró-Reitor: Ricardo Santiago Gomez

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ ICB/ UFMG

Diretor: Tomaz Aroldo da Mota Santos

Vice-Diretora: Janetti Nogueira Francischi

Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Coordenador: Christopher Kushmerick

Trabalho realizado no Laboratório de Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Federal de Minas Gerais.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os
únicos benfeitores do mundo.” (Walter S. Landor)

A Deus à e minha família por tudo sempre e meus amigos
por serem a minha base.

AGRADECIMENTOS

A Deus meu alicerce, que me deu força e luz nos momentos difíceis e duvidosos.

Ao meu pai, que sempre lutou e deu sua vida pela de seus filhos, exemplo de caráter, humildade e amor incondicional aos filhos. Agradeço por ter acreditado e sempre me apoiado mesmo em momentos em que o tempo não me permitiu dar toda atenção e dedicação que merecia.

A minha mãe, pessoa que mais amava nesse mundo, ficou feliz pela minha entrada no mestrado, dava sua vida pela de seus filhos, infelizmente Deus não permitiu que ela pudesse ver essa conquista, mas sei que lá de cima, ela esta muito feliz por mim, e eu a terei sempre comigo, no meu coração e em minhas orações.

Ao meu irmão Daniel, sem seu incentivo, carinho e amizade as chances de ter alcançado esta graça seriam mínimas. Meu alicerce e exemplo de perseverança.

A toda minha família por apoiarem e torcerem para que tudo desse certo.

À professora Silvia Passos Andrade, pela paciência, oportunidade, amizade e exemplo em tudo e aprendizado na área de fisiologia e angiogênese.

Às professoras Juliana Barros e Cibele Campos por acreditarem em mim e serem suporte desta conquista.

À Alejandra, pela amizade e companhia, por sempre estar comigo em momentos

díficeis e por sempre me fazer rir mesmo onde não se via graça. Muito obrigada por ter feito meu Mestrado especial e feliz!! É uma amizade que vou levar pra vida toda!

À Pollyana que mesmo antes de me conhecer me ajudou muito nos estudos e experimentos, e hoje se tornou uma enorme e indispensável amizade, exemplo e determinação e responsabilidade.

À Suzane que com certeza é uma grande conquista do meu Mestrado, agradeço muito a Deus por colocar você no meu caminho, obrigada pela amizade e por tornar os dias cansativos de experimentos mais felizes.

Ao Celso Tarso por fazer do nosso laboratório um espaço alegre, um grande amigo que quero ter sempre na minha vida.

À Brígida, Fabrício, Jousie, Leandro Barbosa, Leandro Ceotto, Luíza, Ciça, Tiago Bruno, aos ICs André, Marcelo, Flávia e Camila pela convivência agradável, amizade e descontração no laboratório.

Às professoras Lucíola Barcelos, Mônica Diniz e Paula Peixoto pelas discussões sobre angiogênese e contribuição.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do CEBIO pelo atendimento cordialidade, ajuda e dedicação aos alunos da pós-graduação.

A todos os professores que contribuíram para a realização deste trabalho e

transmitiram conhecimento em suas aulas.

Às fontes de apoio à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
Ang	Angiotensina
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CNP	Peptídeo Natriurético tipo C
C-ANP ₄₋₂₃	Peptídeo Ligante do Receptor de <i>Clearance</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
Hb	Hemoglobina
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NO	Óxido Nítrico
PN	Peptídeo Natriurético
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
SEM	Erro Padrão da Média
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante β 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular

As demais abreviaturas e siglas foram explicadas quando citadas pela primeira vez no texto

LISTA DE FIGURAS

Figuras Introdução	PÁG.
Figura 1: Modelos de formação de vasos.....	3
Figura 2: Fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão, proteases e outros fatores em comum que promovem angiogênese e inflamação.....	13
Figura 3. Ligação dos peptídeos natriuréticos a seus respectivos receptores.....	16
Figura 4. Imagem do laser Doppler Fluometry.....	31
Figuras Resultados	
Figura 5A. Análise do fluxo sanguíneo nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	39
Figura 5B. Curva dose-resposta do fluxo sanguíneo nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	40
Figura 6A. Análise do conteúdo de hemoglobina nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	41
Figura 6B. Curva dose-resposta do conteúdo de hemoglobina nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	41
Figura 7A. Análise dos níveis de VEGF nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	42
Figura 7B. Curva dose-resposta dos níveis de VEGF nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	43
Figura 8A. Análise dos níveis de nitrito nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	44
Figura 8B. Curva dose-resposta dos níveis de nitrito nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	45
Figura 9A. Análise nos níveis de MPO nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	45

Figura 9B. Curva dose-resposta dos níveis de MPO nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	45
Figura 10A. Análise dos níveis de NAG nas esponjas controle e tratadas com ANP, BNP, CNP o C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	46
Figura 10B. Curva dose-resposta dos níveis de NAG nas esponjas tratadas com C-ANP ₄₋₂₃ 4 dias após implante.....	46
Figura 11A. Imagem de uma análise do laser Doppler em um animal controle e um animal tratado com C-ANP ₄₋₂₃	47
Figura 11B. Análise do fluxo sanguíneo de um animal controle e um animal tratado com 5 doses diárias de C-ANP ₄₋₂₃ 7 dias após o implante.....	48
Figura 11C. Análise do conteúdo de hemoglobina no animal controle e animais tratados com 5 doses diárias de C-ANP ₄₋₂₃ 7 dias após o implante.....	48
Figura 12A. Histologia de uma esponja retirada após 7 dias tratada com PBS.....	50
Figura 12B. Histologia de uma esponja retirada após 7 dias tratada com 5 doses diárias de C-ANP ₄₋₂₃	50
Figura 12C. Contagem no número de vasos nas histologias.....	51
Tabelas	
Tabela 1. Tabela com os moduladores clássicos da angiogênese.....	7
Tabela 2. Tabela de moduladores clássicos e não clássicos da angiogênese.....	8
Tabela 3 (Resultados). Efeito do C-ANP ₄₋₂₃ dose única e doses múltiplas.....	49

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. <i>Angiogênese</i>	1
1.2. <i>Etapas do processo angiogênico</i>	4
1.3. <i>Mecanismos de regulação da angiogênese</i>	5
1.4. <i>Angiogênese inflamatória e modelo experimental para seu estudo</i>	11
1.5. <i>Peptídeos Natriuréticos</i>	15
1.5.1. <i>Peptídeo Natriurético Atrial - ANP</i>	16
1.5.2. <i>Peptídeo Natriurético Cerebral - BNP</i>	17
1.5.3. <i>Peptídeo Natriurético Celular - CNP</i>	19
1.5.4. <i>Peptídeo ligante do receptor de “clearance” - C-ANP₄₋₂₃</i>	20
2. Justificativa	21
3. Objetivos	23
3.1. <i>Objetivo geral</i>	24
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	24
4. Metodologia	26
4.1. <i>Animais</i>	27
4.2. <i>Técnica de implante de esponja</i>	27
4.2.1. <i>Confecção e preparo dos discos de esponja</i>	27
4.2.2. <i>Implante em camundongos</i>	28
4.2.3. <i>Tratamento intrainplante</i>	28
4.2.3.1. <i>Protocolo de dose única</i>	28
4.2.3.2. <i>Protocolo da dose por cinco dias consecutivos</i>	29
4.2.4. <i>Remoção do implante</i>	29
4.3. <i>Avaliação de marcadores angiogênicos</i>	30
4.3.1. <i>Avaliação do fluxo sanguíneo pelo laser Doppler Fluometry</i>	30
4.3.2. <i>Dosagem de Hemoglobina</i>	31
4.3.3. <i>Dosagem de VEGF</i>	32
4.3.4. <i>Quantificação da densidade vascular</i>	33
4.4. <i>Avaliação de marcadores inflamatórios</i>	34
4.4.3. <i>Dosagem de nitrito</i>	34
4.4.1. <i>Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	35
4.4.2. <i>Análise da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)</i>	36
4.5. <i>Análise estatística</i>	37
5. Resultados	38
6. Discussão	52
7. Conclusões	59
8. Abstract	61
9. Referências Bibliográficas	63

RESUMO

Peptídeos natriuréticos (PNs), peptídeos bioativos endógenos, têm sido descritos como moduladores de funções endoteliais e inflamatórias, além de seus já conhecidos efeitos controlando fenômenos como a homeostase de sódio, água e pressão sanguínea. No entanto, os efeitos reportados nos PNs na inflamação e angiogênese variam dependendo do modelo experimental, da dosagem e do tipo de peptídeo. Neste estudo, nós avaliamos os efeitos desses peptídeos na angiogênese inflamatória induzida por implantes de esponja de poliéter poliuretano em camundongos. O conteúdo de hemoglobina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido úmido) e medida do fluxo sanguíneo (laser Doppler perfusion imaging) dos implantes, foram usados como parâmetros na medida de vascularização, mostraram que uma dose única de C-ANP₄₋₂₃ (peptídeo ligante do receptor de clearance), mas não o ANP (peptídeo natriurético atrial), BNP (peptídeo natriurético cerebral ou CNP (peptídeo natriurético tipo C) reduziu a angiogênese nos implantes comparados ao grupo tratado com PBS.

Os peptídeos falharam em modular inflamação em nosso modelo. Análises histológicas corroboram com parâmetros bioquímicos e histológicos indicativos da inibição da neovascularização. A diminuição da vascularização dos implantes pelo peptídeo foi associada com a produção atenuada de óxido nítrico (níveis de nitrito) e níveis elevados de VEGF. O efeito inibitório do C-ANP₄₋₂₃ nos componentes angiogênicos do tecido fibrovascular induzido pela matriz sintética estende a gama de ações dos peptídeos e pode indicar um potencial em controlar angiogênese em doenças fibroproliferativas.

Palavras-Chave: peptídeo natriuréticos, angiogênese, inflamação, implante, VEGF, óxido nítrico.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Angiogênese

O crescimento de vasos sanguíneos foi primeiramente descrito durante a formação da circulação colateral, na cicatrização de feridas e durante o desenvolvimento embrionário normal. Jonh Hunter (1794) foi o primeiro a descrever o desenvolvimento de vasos no embrião de galinha, posteriormente observações similares foram feitas no útero humano (HUNTER, 1794).

O termo angiogênese, tem origem grega (“aggeïon”: vaso; e “gênesis”: formação, constituição). Este termo foi inicialmente usado por Hertig 1935 para descrever o desenvolvimento da placenta de macacas, sendo atualmente empregado para descrever a formação de vasos capilares a partir de outros pré-existentes, ou seja, a neoformação vascular (COHEN, 2002; FOLKMAN et al, 1989).

Novos vasos sanguíneos podem ser formados através de dois processos distintos, a saber, vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese envolve o recrutamento de células derivadas da medula óssea e/ou células progenitoras endoteliais (EPCs) residentes da parede vascular em células endoteliais, formando uma rede vascular inicial durante o desenvolvimento embrionário (LIU, 2014). O desenvolvimento vascular pós-natal, também pode envolver a vasculogênese, pois as células derivadas da medula óssea também têm sido mostradas estarem presentes no endotélio de novos vasos sanguíneos em adultos (RIBATTI et al, 2001). A neoformação vascular a partir de vasos pré-existentes, denominado como angiogênese, pode ocorrer por brotamento, intussuscepção, co-optação, mimetismo e diferenciação (Figura1) (GOODWIN, 2007; CARMELIET & JAIN, 2011).

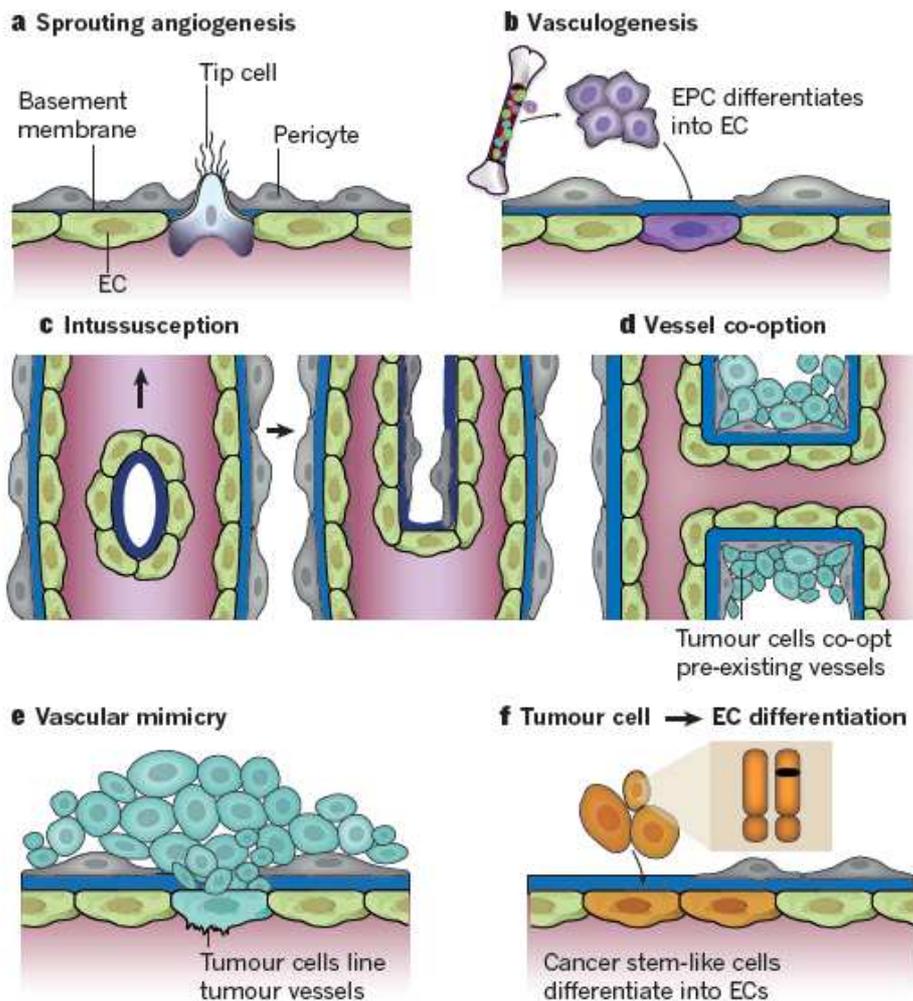


Figura 1: Modelos de formação de vasos. Existem vários processos conhecidos de formação de vasos sanguíneos em tecidos normais e em tumores, **a–c**. A formação de vasos pode ocorrer por angiogênese por brotamento (**a**), através do recrutamento de células derivadas da medula óssea e/ou células progenitoras endoteliais (EPCs) residentes da parede vascular que se diferenciam em células endoteliais (**b**) ou por um processo de divisão do vaso conhecido como intussuscepção (**c**). **d–f**, As células tumorais também podem co-optar vasos pré-existent (**d**), ou vasos tumorais podem ser revestidas por células tumorais (mimetismo vascular, **e**) ou por células endoteliais, com anomalias citogenéticas em seus cromossomos, derivadas de células-tronco do câncer (**f**). Ao contrário de tecidos normais, em que a angiogênese se dá apenas por brotamento, vasculogênese e intussuscepção (**a-c**), os tumores podem usar todos os seis modos de formação de vasos (**a–f**) (CARMELIET & JAIN, 2011).

A angiogênese fisiológica (cicatrização, revascularização do endométrio, preparo de mamas para a lactação) tem duração curta (dias ou semanas). Após o restabelecimento do fluxo sanguíneo normal no local do estímulo, este cessa e ocorre a involução dos vasos neoformados com retorno das células endoteliais ao estado quiescente (GOODWIN, 2007). Na angiogênese patológica (inflamação crônica, retinopatias, tumores) o processo persiste por meses ou anos de maneira incontrolada, os vasos

sanguíneos neoformados são, normalmente, defeituosos, levando a quadros de hemorragias e oclusões dos mesmos (GOODWIN, 2007).

1.2. Etapas do processo angiogênico

As etapas envolvidas no processo de angiogênese foram inicialmente observadas por Sandison et al (1924) e posteriormente descritas por Ausprunk & Folkman (1977).

A neoformação de vasos tem início a partir da dilatação de vasos pré-existentes (vênulas ou capilares). Sob influência de um estímulo angiogênico, as células endoteliais são ativadas, formando projeções em suas superfícies, aumentando o número de organelas intracelulares e aumentando a produção de enzimas proteolíticas (metaloproteinases). As enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular permitindo a penetração endotelial no espaço perivascular (DISTLER et al, 2003).

Seguindo a degradação da matriz, as células endoteliais migram em torno do tecido em resposta a quimiocinas angiogênicas. Fatores de crescimento podem contribuir para a mobilidade das células endoteliais fazendo com que o movimento aleatório de células (quimiocinese) ou para a migração dirigida para um fator estimulante (quimiotaxia) (GOODWIN, 2007).

O próximo passo é a proliferação destas células para a formação do lúmen tubular. A partir daí começam a aparecer ramificações, com eventual conexão entre os brotos, e uma rede de novos tubos é formada. A última fase consiste na maturação e estabilização do vaso, na qual, novos componentes da matriz extracelular (MEC) são produzidos e depositados sob a forma de nova membrana basal. A estabilização do vaso sanguíneo neo-formado é alcançada após a migração de células mesenquimais para a proximidade dos neovasos, e a posterior diferenciação deste tipo celular em pericitos ou células

musculares lisas, e pela regeneração da matriz extracelular e membrana basal (HIRSCHI e D'AMORE, 1997; JAIN, 2003).

1.3. *Mecanismos de regulação da angiogênese*

Os mecanismos de regulação do processo angiogênico envolvem uma seqüência de eventos que são influenciados por sinais biológicos como hipóxia, citocinas e fatores de crescimento (OTROCK et al., 2007; FOLKMAN & GREENSPAN, 1975). Os fatores de crescimento fazem parte de uma subclasse de citocinas que estimulam especificamente, a migração e proliferação celular (GREENHALGH, 1996). Estes fatores podem agir estimulando a migração e/ou proliferação das células endoteliais, ou estimulando células do hospedeiro a secretar fatores de crescimento quimiotáticos, ou promovendo a liberação de mitógenos endoteliais estocados na matriz extracelular ou em depósitos intracelulares (FOLKMAN, 2006). A angiogênese é um fenômeno complexo controlado pelo equilíbrio entre diversas moléculas que possuem atividades regulatórias positivas ou negativas, o que levou a criação do termo “interruptor angiogênico”, que dependeria de sua ativação pela produção de um ou mais elementos angiogênicos (FOLKMAN, 1971; RIBATTI, CONCONI, NUSSDORFER, 2007). De acordo com este princípio, a angiogênese pode ser o resultado de um excesso de atividade dos fatores pró-angiogênicos ou de uma redução da atividade dos fatores anti-angiogênicos (ZHANG et al., 2011).

Os reguladores positivos clássicos da angiogênese podem ser divididos, esquematicamente, em dois grandes subgrupos: os fatores de crescimento e as citocinas. Entre os fatores de crescimento salientam-se o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), e fatores

estimulantes da multiplicação de granulócitos e monócitos (GM-CSF). O VEGF é um dos fatores mais críticos e específicos que induz várias funções endoteliais ligadas à angiogênese, incluindo migração e proliferação das células endoteliais (KROLL et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Entre as citocinas, realce para a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) (FONTELONGA, 2002). Dentre os reguladores negativos clássicos da angiogênese encontram-se principalmente a trombostatina, angiostatina e endostatina que agem na inibição da proliferação e migração de células endoteliais, assim como na inibição da formação de novos vasos sanguíneos mostrado em ensaios *in vivo* e *in vitro* em camundongos e em córnea de coelhos (RIBATTI et al, 2002; FOLKMAN, 2006; REN et al, 2006; RUEGG et al, 2006) (Tabela 1).

TABLE 1
Main features of classic proangiogenic and antiangiogenic factors

Factor	Receptors	Signaling Pathways ^a	Angiogenic Activity ^b				
			In Vitro Assays (ECs)		Differentiation (Capillary Tube Formation)	In Vivo Assays (New Vessel Formation)	
			Proliferation	Migration		CAM	Rabbit Cornea
VEGF	VEGF-R ₁ , VEGF-R ₂	+ PLC γ /PKC + MAPK	S	S	S	S	S
FGF-2	FGF-R ₁ , FGF-R ₂ , FGF-R ₃ , FGF-R ₄	+ MAPK	S	S	S	S	S
TGF- β	TGF- β -R ₁ , TGF- β -R ₂	+ ALK-1 and -5 + SMAD1/5 and 2/3	I	N	S	S	S
PDGF	PDGF-R	+ PI3K + SFK + Ras GAP	N	S	=	S	S
Angiopoietin-1	Tie 2	+ PI3K + Pac GTPase	N	S	S	S	S
Thrombospondin-1	VEGFLRP-1	+SRCK	I	I	I	I	I
Angiostatin	α v β 3 Integrin	-MAPK	I	I	I	I	I
Endostatin	α 5 β 1 Integrin, VEGF-R ₂	-MAPK	I	I	I	I	I

^a +, stimulation; -, inhibition.

^b I, inhibition; N, no effect; S, stimulation; =, no findings available.

Tabela 1: Principais moduladores clássicos da angiogênese (RIBATTI et al, 2007)

Recentemente, há um acúmulo de evidências indicando que em adição aos fatores clássicos pró- e anti-angiogênicos, vários outros peptídeos endógenos e seus respectivos receptores possuem um importante papel na regulação da angiogênese, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Ribatti e cols (2007) descreveram e sumarizaram

a atividade anti- e pró-angiogênica desses peptídeos classificando-os como sendo “reguladores endógenos não clássicos da angiogênese”. Tem sido demonstrado que a eritropoítina (EPO) (ANAGNOSTOU et al., 1990; RIBATTI et al., 2003), a angiotensina-II (Ang-II), (LE NOBLE et al., 1991; ANDRADE et al., 1992) a endotelina-1 (ET-1), (MOLET S, et al 2000), a adrenomedulina (AM) (NAGAYA et al., 2005) e o neuropeptídeo-Y (NPY) (SHIGERI & FUJIMOTO, 1993) possuem potente atividade pró-angiogênica *in vivo* e *in vitro* e ainda promovem crescimento tumoral e vascularização.

Foram compilados também por Ribatti e cols (2007) fatores negativos não clássicos da angiogênese. Dentre estes fatores estão, entre outros, a angiotensina (1-7) e os peptídeos natriuréticos.

TABLE 2
Main features of nonclassical proangiogenic and antiangiogenic factors

Factor	Receptors	Signaling Pathways ^a	Angiogenic Activity ^b										
			In Vitro Assays (DCA)			In Vivo Assay (New Vessel Formation)			Thrombosis and Vascularization	Interaction with Other Factors ^c			
			Differentiation (Capillary Tube Formation)	Proliferation	Migration	Diffusion	CAI	Rabbit Cornea			Sponge Model	Experimental Ischemia	
EPO	EPO-R, EPO-BB	+ HSK/SH + JAK/STAT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	↑ ET-1
ANG-II	AT ₁ -R, AT ₂ -R	+ NOS/NO ?	-S	SI	S	S	S	S	S	S	S	S	↑ VEGF
ET	ET _A -R, ET _B -R	+ BK ₁ + GPCR/DOX	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	↑ VEGF
AM	AM ₁ -R, AM ₂ -R	+ AC + Akt + MAPK	I	S(N)	S	S	S	S	S	S	S	S	↑ VEGF (?)
PAMP	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑ VEGF FGF-2/↑ PDGF (?) ?
Urokinase-II Leptin	UT-R Ob-Ra, Ob-Rb	? + MAPK + STAT3	-	N	-	-	S	S	S	-	-	-	S (?) -
Adiponectin	AdipoR ₁ , AdipoR ₂	+ AMP kinase	I	(I)	(I)	-	(I)	(I)	S	S	S	S	↑ VEGF FGF-2/↑ PDGF (?) ?
Resistin	?	+ FSK + MAPK	-	S	-	S	-	-	-	-	-	-	↑ VEGF
NPY	Y ₁ -RY ₅ -R (Y ₆ -R)	+ MAPK	-	S	S	S	-	-	S	S	S	S	?
VIP (PACAP)	VPAC ₁ -R	+ PKA + PI3K + MAPK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑ VEGF
Substance-P	NK ₁ -R	+ H ₂ O/PRG + NOS/NO	-	S	S	-	-	-	S	S	-	-	?
Somatostatin	sst2R, sst3R (sst1-1R/ sst1-5R)	- MAPK - NOS/NO	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	↓ VEGF
Ghrelin	GHS-R1a	- MAPK - PI3K/Akt	S	I	-	I	I	I	-	-	-	-	?
Natriuretic peptides	A-RC-R (B-E)	- MAPK - JNK	-	I	-	I	-	-	-	-	-	-	↓ VEGF

BK₁, Ob² activated large conductance potassium channel; COX, cyclooxygenase; AC, adenylyl cyclase; NK, cholin N-terminal kinase.
^a +, stimulation; -, inhibition.
^b I, inhibition; N, no effect; S, stim action; -, no findings available.
^c ↑, up-regulation; ↓, down-regulation.
^d Results of some uncertain findings.

Tabela 2: Moduladores não clássicos da angiogênese, onde se encontram os peptídeos natriuréticos, avaliados por ensaio *in vitro* apresentando atividade de inibição da proliferação e migração de células endoteliais e formação de tubo (RIBATTI et al, 2007)

Evidências convincentes têm mostrado que os peptídeos natriuréticos (PNs) modulam funções das células endoteliais e inflamatórias, além de seus já conhecidos efeitos controlando sódio, água e homeostase da pressão sanguínea (ANAND-SRIVASTAVA, 2005). Essa família de pequenos peptídeos que consistem em PN atrial (ANP), PN cerebral (BNP) e PN tipo C (CNP) atuam através de receptores de guanilil

ciclato tipo A e B estimulando a produção de GMPc (ANAND-SRIVASTAVA, 2005; LEVIN, GARDNER AND SAMSON,1998). O primeiro receptor interage com o ANP e o BNP enquanto o receptor tipo B é específico para o CNP (PEDRAM, RAZANDI, HU AND LEVIN, 1997). Além disso, o receptor tipo C é ativado pelos peptídeos endógenos e pelo peptídeo natriurético sintético ligante do receptor de clearance (C-ANP₄₋₂₃) causando diminuição da atividade de adenilil ciclase através da proteína inibitória Gi.

Estudos têm mostrado que o ANP, o BNP e o CNP exercem atividade inibitória na migração, proliferação e formação de tubo de células endoteliais humanas e em modelo *in vitro* de células endoteliais aórticas bovinas, suprimindo a sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PEDRAM et al., 1997a,b; 2001). Além disso, estudos mais recentes mostraram que o ANP foi capaz de reduzir o extravasamento vascular e neovascularização coroidal (LARA-CASTILLO et al. 2011). Corroborando com as atividades indicativas do efeito anti-angiogênico dos peptídeos endógenos, estudos mostraram que o C-ANP₄₋₂₃, um agonista sintético seletivo do receptor tipo C, foi capaz de diminuir o aumento da proliferação de células do músculo liso vascular em ensaios *in vivo* e *in vitro* em ratos espontaneamente hipertensos (ANDALOUSI, LI, ANAND-SRIVASTAVA, 2013).

Esses efeitos têm sido associados com o remodelamento vascular e angiogênese (PEDRAM, RAZANDI, HU AND LEVIN 1997, ANDALOUSI, LI, ANAND-SRIVASTAVA, 2013). Visando avaliar a atividade dos peptídeos sobre a inibição de neovasos vários autores têm proposto que os PNs possam exercer um potencial terapêutico em doenças oculares onde o VEGF exerce um papel central, assim como em doenças fibroproliferativas.

Assim, em conjunto esses dados indicam que os PNs modulam a angiogênese negativamente. Em contraste, esses peptídeos têm sido mostrados estimulando a angiogênese, a proliferação e migração endotelial em cultura da microvasculatura do

coração hipertrófico de ratos (KUHN et al., 2009). Além disso, estes autores mostraram que o BNP promoveu crescimento vascular por aumentar o número de progenitores endoteliais e melhorando suas propriedades funcionais. Essas propriedades pro-vasculogênicas do BNP poderiam explicar alguns dos seus efeitos benéficos em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e pode ser utilizado com a finalidade de melhorar a formação colateral em indivíduos isquêmicos (SHMILOVICH et al., 2009).

Recentemente estudos têm focado também na associação dos PNs e inflamação. Foi descrito em um modelo *in vitro* que o BNP tem a habilidade de modular a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos ativados como prostaglandinas e citocinas (TNF α , IL-12 and IL-10), além de aumentar a produção de NO $_2$ e de ERO (Eritropoietina) sugerindo uma atividade pró-inflamatória deste peptídeo (CHIURCHIÙ V et al, 2008). Além disso, estudos também mostraram que o ANP induz a diminuição da infiltração de macrófagos, da proteína quimioatrativa de monócito-1 (MCP-1) e de uma molécula pró-inflamatória, a tenascina-C (TN-C) em um modelo *in vivo* com ratos Wistar (FUGITA et al, 2013). Foi demonstrado também a participação dos PNs na modulação do óxido nítrico, um mensageiro difusível que desempenha uma variedade de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de vasos, inibição da agregação de plaquetas, inflamação, migração e apoptose. Foi proposto que sua via de sinalização (NO/sGC/cGMP), complementa as vias dos PN (peptídeo natriurético/pGC/cGMP), tanto que a expressão de uma via diminui a sensibilidade de outra (MADHANI M, et a, 2003).

Assim, com base nas ações relatadas da modulação dos PNs positiva ou negativa na proliferação e migração de um número de células envolvidas em processos patológicos fibroproliferativos, nós postulamos que os PNs também poderiam modular a angiogênese inflamatória no modelo de esponja em camundongos.

1.4. *Angiogênese inflamatória e modelo experimental para seu estudo*

Durante uma resposta inflamatória, se há permanência do estímulo lesivo, ocorre a cronificação do processo inflamatório; que, por sua vez, será caracterizado por um aumento de macrófagos no local, proliferação de fibroblastos o que aumenta a síntese de matriz extracelular, angiogênese e lesão tecidual. Esse aumento da angiogênese propicia um aumento do infiltrado inflamatório, o qual irá liberar substâncias pró-angiogênicas, e assim, criando um ciclo vicioso. A inflamação e a angiogênese ocorrem freqüentemente simultanea e sinergicamente em situações patológicas, de maneira co-dependente (JACKSON et al, 1997). A inflamação é um processo complexo que requer distintos tipos e fatores celulares, os quais atuam de modo coordenado sendo ainda reforçado pela ocorrência do processo angiogênico (LIEKENS et al., 2001). A hipóxia é um estímulo comum aos dois processos, resultando na acumulação de macrófagos e outras células imunes bem como, no aumento da produção de fatores de crescimento (MURDOCK et al, 2005; CARMELIET & JAIN, 2000).

A angiogênese sustenta a inflamação através do fornecimento de oxigênio e nutrientes para as necessidades metabólicas das células presentes no sítio inflamatório. Isto é realizado, em primeiro lugar, pela produção de NO, um agente inflamatório produzido pela ativação da NO sintase induzida (iNOS) em células inflamatórias. O NO está envolvido em um número de funções regulatórias na inflamação. Isso inclui controle de infecção, regulação da sinalização de cascatas de fatores de transcrição, regulação de respostas vasculares, regulação da migração de leucócitos, produção de citocinas, proliferação e apoptose. A inibição da síntese do NO, especialmente inibidores seletivos da iNOS, está associada à ação anti-inflamatória em várias formas de inflamação experimental como artrites e colites (KORHONEN, 2005; CHARO E TAUBMAN, 2004). Muitos outros mediadores como citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas

durante a inflamação são potentes ativadores das células endoteliais vizinhas, aumentando nestas, a expressão de moléculas de adesão importantes para o processo de rolagem, ativação, adesão e transmigração das células inflamatórias sanguíneas para a área de lesão (LEY, 2001). Ambas, a inflamação e a angiogênese são exacerbadas pelo aumento da produção de quimiocinas/citocinas, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, proteoglicanos, mediadores de lipídios e prostaglandinas (ONO, 2008). As células inflamatórias podem, ainda, elas mesmas liberar diretamente fatores angiogênicos como o VEGF, Ang, bFGF, PDGF, TGF- β , TNF- α , dentre muitos outros, os quais irão exercer efeitos mitogênicos e migratórios sobre o endotélio (BENELLI et al., 2006; NALDINI, A; CARRARO, 2005).

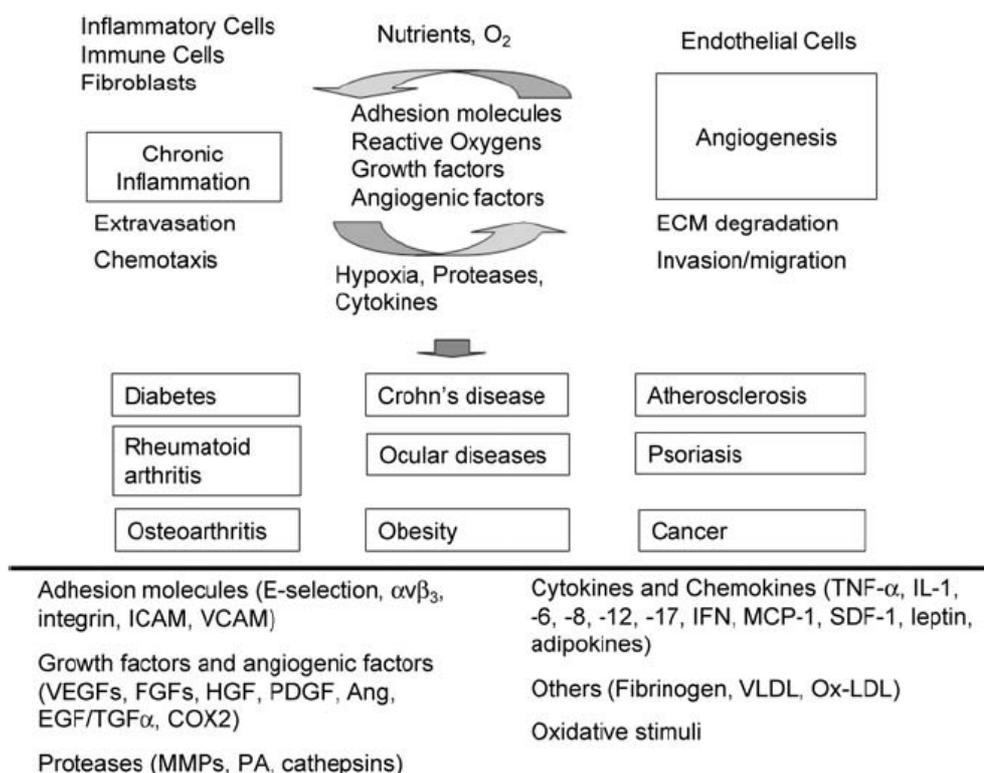


Figura 2: Fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão, proteases e outros fatores promotores da angiogênese e inflamação. Ang, angiopoietina; COX2, ciclooxigenase 2; ECM, matriz extracelular, EGF, fator de crescimento epidérmico, o FGF, o fator de crescimento de fibroblastos, HGF, o fator de crescimento de hepatócitos; ICAM, molécula de adesão intercelular; IFN, Interferon; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrativa de monócito, MMP, matriz metalopeptidase; Ox-LDL, lipoproteína oxidada de baixa densidade, PA, ativador de plasminogênio; PDGF, fator de crescimento derivado das plaquetas; SDF, fator derivado do estroma celular; TGF, fator de crescimento transformante; TNF, fator de necrose tumoral, VCAM, molécula de adesão celular vascular, VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; VLDL,

lipoproteína de baixa densidade, (ONO, 2008).

O modelo de implantação subcutânea das matrizes esponjosas em animais foi descrito inicialmente por Grindlay e Waugh (1951) e modificado por Andrade e cols. (1987). Este modelo proporciona um microambiente cronicamente inflamado em que cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado (ANDRADE *et al.*, 1997; BELO *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2006).

As matrizes esponjosas inicialmente acelulares e não vascularizadas são implantadas no tecido subcutâneo do animal, um processo complexo dirigido inicialmente por células inflamatórias que se acumulam dentro do compartimento da esponja e posteriormente por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria (ANDRADE *et al.*, 1997). Utilizando-se esta abordagem experimental tem sido possível caracterizar a sequência de alterações histológicas na formação do tecido de granulação e monitorar a cinética de proliferação celular. A medida do acúmulo de neutrófilos e macrófagos no compartimento da esponja tem sido possível através da determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) respectivamente. O modelo de inflamação aguda é particularmente útil, permitindo a coleção e análise das fases fluidas e celulares do exsudato formado dentro da esponja (ANDRADE & FERREIRA, 2009). Além disso, este modelo tem sido usado para avaliar o efeito de compostos com atividade que modulam a angiogênese e a inflamação.

Tendo em vista os efeitos contraditórios dos peptídeos vasoativos na migração e proliferação de células endoteliais apresentados na literatura em diferentes ensaios experimentais, bem como o seu envolvimento em processos patológicos do sistema vascular, postulamos que a utilização do modelo de implante de esponja poderia avaliar potenciais atividades do ANP, BNP, CNP e do C-ANP₄₋₂₃ na modulação da inflamação e

da angiogênese no modelo de implante de esponja.

1.5. *Peptídeos Natriuréticos*

Os peptídeos natriuréticos são uma família de pequenas proteínas que modulam o equilíbrio de sódio e água e a biologia vascular. Esta família inclui o peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e péptido natriurético tipo C (CNP) (LEVIN et al., 1998). Estes três peptídeos se ligam a 3 subtipos de receptores: ao subtipos A (NPR-A), subtipo B (NPR-B) e ao subtipo C (NPR-C). NPR-A e NPR-B são receptores de guanilil ciclase, sendo que sua ativação resulta no aumento de níveis de GMPc. Além disso, a ativação desses receptores induzem a diminuição da atividade da fosfolipase C, estimulação da eNOS ou inibição da atividade MAPK estimulada pela endotelina (ANANDI-SRIVASTAVA, 2005). O NPR-C, que é também denominado de receptor de *clearence*, está acoplado a proteína G inibitória e sua ativação consiste da inibição da atividade do adenil ciclase. O domínio citoplasmático de NPR-C contém várias sequências ativadoras Gi que mostraram um potencial na inibição da atividade de adenilil-ciclase (PAGANO, 2001) e na atenuação da endotelina-1 (ET-1), Ang-II e arginina-vasopressina (AVP) (ANDALOUSI, 2013).

No NPR-A interagem preferencialmente ANP e BNP; o NPR-B é seletivo. Apenas para CNP, e no NPR-C interagem ANP, BNP, CNP assim como o C-ANP₄₋₂₃, um análogo ao ANP com um anel excluído que interage especificamente com este receptor (ANANDI-SRIVASTAVA, 2005).

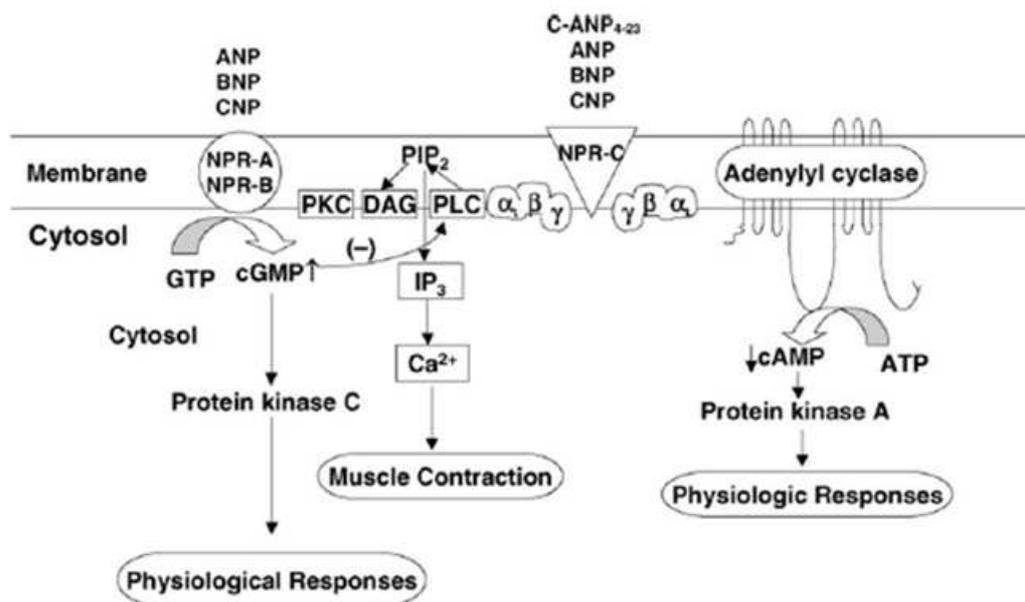


Figura 3: Receptores de peptídeos natriuréticos e mecanismos de transdução de sinal associadas ativados por diferentes peptídeos natriuréticos. NPR-A e NPR-B são ativados pelo ANP, BNP e CNP e resultam na estimulação da formação de GMP cíclico. O último inibe fosfolipase C (PLC) e resulta em diminuição da produção de diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP₃). O outro tipo principal de receptor é NPR-C, o qual é acoplado a adenilil ciclase através da proteína Gi. C-ANP₄₋₂₃ (um péptido análogo ao ANP com anel excluído), ANP, BNP e CNP interagem com este receptor e inibem a atividade da adenil ciclase e suprimem concentrações de AMPc, (ANAND-SRIVASTAVA, 2005).

1.5.1. Peptídeo Natriurético Atrial - ANP

A maior forma molecular encontrada do peptídeo natriurético atrial circulante possui 28 aminoácidos sintetizado e secretado pelo coração com uma estrutura em anel formada por um acoplamento intramolecular de dissulfureto. Seus níveis teciduais são 250-1000 vezes superiores no átrio do que no ventrículo (KANGAWA & MATSUO, 1984).

O ANP regula uma variedade de parâmetros fisiológicos, nos vasos sanguíneos ele relaxa a musculatura lisa, aumenta a permeabilidade de [capilares](#) e conseqüentemente permite a saída de [água](#) e [sódio](#) dos vasos sanguíneos. Além disso, o hormônio também inibe a função de vários outros hormônios, como [aldosterona](#),

[angiotensina II](#), [endotelina-1](#), [renina](#) e vasopressina. Nos rins, ele inibe a reabsorção de sódio nos ductos coletores dos [néfrons](#), inibe a ação da aldosterona e neutraliza o sistema renina-angiotensina-aldosterona (ANDALOUSI, 2013; PANDEY, 2005).

Patologicamente os níveis plasmáticos de ANP são aumentados em condições como insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e hipertensão pulmonar (NISHIKIMI, T, 2011).

Não é utilizado na clínica devido sua baixa meia vida (COLUCCI et al, 2000).

1.5.2. *Peptídeo Natriurético Cerebral - BNP*

A forma molecular ativa do peptídeo natriurético cerebral humano contém 32 aminoácidos. Foi isolado inicialmente do cérebro de suíno, no entanto logo depois do descobrimento uma maior concentração foi mostrada estar no coração, onde ele age como hormônio cardíaco. Recentemente, estudos mostraram que nenhuma quantidade apreciável de BNP foi encontrada no cérebro humano ou de rato, o que sugeriu que a distribuição de BNP difere entre as espécies (SUDOH et al., 1988). Em comparação com a homologia de sequência de aminoácidos do ANP e do CNP que são estritamente conservadas, a homologia de sequência do BNP se difere entre as espécies, tanto no tamanho quanto na sequência de aminoácidos. Essa variabilidade de sequência pode explicar, em parte, as variações das atividades biológicas do BNP em diferentes espécies (CASSERLY, 2009).

Assim como o ANP, a maior concentração de BNP encontra-se predominantemente no átrio e seus níveis também são aumentados durante insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e hipertensão pulmonar (NISHIKIMI, 2011).

Estudos *in vitro* também demonstraram que o BNP antagoniza os efeitos da [TGF-β](#)

(Fator de Crescimento Transformante - um importante fator regulador do crescimento e desenvolvimento celular) nas células em crescimento; também inibe a produção de [colágeno](#) e [fibronectina](#), bem como a expressão de vários genes pró-inflamatórios, pró-fibróticos e pró-transformantes em miofibroblastos cardíacos cultivados. Este estudo também revelou que o BNP, por si só, afeta apenas a expressão de alguns genes, porém, ao alterar os efeitos de TGF- β , afeta a expressão de centenas de genes (PANDEY, 2005).

A análise das concentrações do BNP no sangue por ensaio imunofluorimétrico é uma ferramenta de avaliação terapêutica em situações clínicas críticas, tais como insuficiência cardíaca descompensada e embolia pulmonar (COLUCCI et al, 2000).

Na clínica, o uso de infusão intravenosa do um peptídeo natriurético tipo-B recombinante, em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada é hemodinamicamente benéfico e melhora significativamente os sintomas de insuficiência cardíaca, quando comparado ao placebo, porém não é usado como primeira escolha pelo risco de hipotensão sintomática (COLUCCI et al , 2000).

1.5.3. Peptídeo Natriurético Celular - CNP

A estrutura anelar de 22 aminoácidos do CNP é altamente homóloga com ANP e BNP, dividindo uma estrutura em comum que consiste em 17 aminoácidos ligados por ponte de dissulfureto intramolecular, mas no CNP singularmente, falta a extensão carboxi-terminal (KOMATSU et al., 1991).

Inicialmente, este peptídeo foi também isolado do cérebro de suínos, mas hoje se sabe que ele é sintetizado principalmente nas células endoteliais sendo também sintetizado nos rins, ossos, células sanguíneas, vasos sanguíneos e coração. Nos vasos sanguíneos é responsável por vasodilatação (SUGA et al., 1992).

A secreção do CNP pelas células endoteliais é estimulada por citocinas, tais como TGF- β , fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1, fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) e lipopolissacarídeos. Isso sugere que o CNP pode ser ativado na parede vascular em várias condições patológicas. Por outro lado, as análises confirmaram a presença de CNP e seu mRNA em ambos átrio e ventrículo, e recentes estudos *in vitro* verificaram que uma quantidade significativa de CNP é expressada e secretada em fibroblastos cardíacos, indicando um perfil de expressão cardíaca diferente do ANP e BNP (HORIO et al., 2003).

O CNP não é comumente usado na clínica devido ao seu curto tempo de meia vida. Porém estudos em animais têm relatado uma possível utilidade de um análogo do CNP (BMN 111), cuja meia vida é estendida, no tratamento de acondroplasia (Lorget, 2012).

1.5.4. Peptídeo ligante do receptor de "clearance" - C-ANP₄₋₂₃

O C-ANP₄₋₂₃, diferentemente dos outros peptídeos natriuréticos, não interfere no sistema de guanilil ciclase/GMPc, mas ainda assim tem sido descrito como um regulador de uma variedade de processos fisiológicos envolvendo a homeostase cardiovascular (ANANDI-SRIVASTAVA., 1990). É um peptídeo análogo ao ANP com anel excluído [dês (Gln,Ser,Gln,Leu,Gly)ANP₄₋₂₃-NH₂] que interage seletivamente com o receptor NPR-C inibindo a atividade da adenil ciclase através da proteína Gi, uma atividade concentração-dependente demonstrado em estudos em artérias, pituitária anterior e membranas do córtex adrenal em ratos, sem interferir nos níveis de GMPc (ANANDI-SRIVASTAVA. et al., 1990).

Resultados da literatura mostraram que quando o C-ANP₄₋₂₃ se liga ao NPR-C acontece a inibição da via do AMPc, o que implica na modulação da permeabilidade das

células endoteliais coronarianas (ANANDI-SRIVASTAVA. et al., 1990).

Estudos também mostraram que o C-ANP₄₋₂₃ estimula *turnover* do IP₃ (trifosfato de inositol) nas células do músculo liso vascular e inibe a produção do VEGF e endotelina-1, sugerindo a implicação do NPR-C na remodelação vascular e angiogênese (ANANDI-SRIVASTAVA 2005; PEDRAM A. et al 1997a). Além disso, um estudo realizado em ratos espontaneamente hipertensos mostrou que a ativação do NPR-C pelo C-ANP₄₋₂₃ atenuou o aumento da proliferação de células do músculo liso vascular pela diminuição da expressão de proteínas do ciclo celular (ANDALOUSI, 2013).

2. Justificativa

Em vários tipos de patologias dependentes de angiogênese inflamatória, o controle da formação de novos vasos sanguíneos é perdido, seja por excesso ou deficiência dos mesmos. A identificação de compostos com atividade pró-angiogênica ou anti-angiogênica tem propiciado o desenvolvimento da terapêutica angiogênica, que consiste na administração tópica ou sistêmica destes compostos nas patologias acompanhadas por distúrbios de neovascularização (FOLKMAN, 1995).

A inibição da neoformação de vasos tem obtido êxito na supressão do crescimento de tumores sólidos (KIRSTEIN, 2006; FOLKMAN, 1995) e na inibição da progressão de inflamações crônicas (KIRSTEIN, 2006; PEACOCK et al., 1985). Desse modo, a busca por agentes terapêuticos anti-angiogênicos que atuem em pontos diferenciados da cascata angiogênica ou que atuem na inibição do processo inflamatório, constituem uma importante linha de pesquisa para a descoberta de novos tratamentos para eventos inflamatórios e angiogênicos de doenças crônicas como a artrite reumatóide, retinopias, aterosclerose e tumores. Tendo em vista que os peptídeos natriuréticos exercem efeitos na atividade das células endoteliais e que condições patológicas, nossa proposta foi in

2. *Justificativa*

ANP₄₋₂₃ nos vários componentes do tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja em camundongos.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar a atividade de peptídeos natriuréticos (peptídeo natriurético atrial-ANP, peptídeo natriurético cerebral-BNP, peptídeo natriurético celular-CNP e peptídeo ligante do receptor de *clearance* do ANP [C-ANP₄₋₂₃]) na modulação da angiogênese em modelo de implante de esponja em camundongo.

3.2. *Objetivos específicos*

- ✓ Determinar o efeito dos peptídeos ANP, BNP, CNP e C-ANP₄₋₂₃ na modulação dos componentes inflamatórios e angiogênicos do tecido fibrovascular.
- ✓ Determinar os efeitos dos PNs em parâmetros funcionais, bioquímicos e moleculares, indicativos da formação de vasos sanguíneos, quantificados por meio do fluxo sanguíneo, conteúdo de hemoglobina e dosagem da citocina VEGF.
- ✓ Avaliar os efeitos dos PNs no componente inflamatório do tecido fibrovascular por meio da atividade de enzimas inflamatórias (Mieloperoxidase e n-acetil-β-D-glucosaminidase) e níveis de óxido nítrico.

3. *Objetivos*

- ✓ Determinar por histologia as características do tecido fibrovascular (densidade vascular e celularidade) de implantes tratados e não tratados com peptídeos natriuréticos.

4. Metodologia

4. *Metodologia*

4.1. *Animais*

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, com idade entre seis a oito semanas, pesando aproximadamente 30 gramas (g), provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

4.2. *Técnica de implante de esponja*

4.2.1. *Confecção e preparo dos discos de esponja*

Discos de esponja de poliéster-poliuretano foram confeccionados através de um *punch* cirúrgico (8 mm de diâmetro x 5 mm de espessura). Em seguida, os discos foram acondicionados em etanol 70% v/v durante 24 horas antes da implantação das esponjas.

Antes do início do procedimento cirúrgico, os mesmos foram lavados e fervidos em água destilada por aproximadamente 30 minutos.

4.2.2. *Implante em camundongos*

Para o implante dos discos de esponja os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (150mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), submetidos à tricotomia e à assepsia da região dorsal subcutânea. Em seguida foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na pele e, após divulsão do tecido subcutâneo, o disco de esponja foi introduzido na região dorsal subcutânea. Após o implante, a incisão foi suturada com fio inabsorvível.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em observação e assim que recuperaram foram acomodados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração (ANDRADE et al, 1987, RIBEIRO et al , 2012, MARQUES et al 2011).

4.2.3. Tratamento intrainplante

4.2.3.1. Protocolo de dose única

No primeiro protocolo, os animais foram divididos em grupos controle ou tratados com 10 animais por grupo. Um grupo de animais foi tratado com injeção intrainplante do solvente do composto de interesse PBS (40 µL), e o outro grupo recebeu dose única de 200ng diluído em 40µL de PBS de ANP (PM: 3080,44); ou BNP (3464,06) ou CNP (2197,60) ou C-ANP₄₋₂₃ (2257,14) imediatamente após o procedimento cirúrgico.

A dose dos peptídeos foi escolhida com base em dados da literatura em diferentes modelos experimentais na faixa de nmol/Kg (ANDALUOSI et al. 2013).

Os animais foram sacrificados após 4 dias.

Foi realizada também uma curva dose resposta do C-ANP₄₋₂₃ . Os animais foram divididos em 5 grupos com 10 animais cada. O grupo controle recebeu 40µL de PBS, os seguintes 2, 20, ou 200ng de C-ANP₄₋₂₃. Os animais foram sacrificados após 4 dias.

4.2.3.2. Protocolo da dose por cinco dias consecutivos

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10 animais cada. O grupo controle recebeu 40µL de PBS, um grupo recebeu dose única do peptídeo (200ng) e o outro recebeu a dose de 200ng em 40µL de PBS por cinco dias consecutivos de C-ANP₄₋₂₃ intrainplante. Os animais foram sacrificados após 7 dias.

4.2.4. Remoção do implante

Quatro e sete dias pós-implantes dos discos de esponja, os animais foram anestesiados para determinação do fluxo sanguíneo através de laser Doppler. Logo após foi administrada uma dose letal do anestésico. Os implantes de esponja foram retirados, pesados e processados para análises bioquímicas e histológicas.

4.3. Avaliação de marcadores angiogênicos

4.3.1. Avaliação do fluxo sanguíneo pelo laser Doppler Fluometry

A técnica baseia-se no princípio de Doppler em que a luz de um laser monocromático incide sobre o tecido onde é, então, dispersa pelas hemácias em movimento e, como consequência, a frequência é ampliada. As ondas refletidas são, então, captadas e processadas pelo equipamento que, por sua vez, codifica isso em um espectro de cores. As cores mais "frias" (azul) representam falta de movimento (isto é, falta de fluxo sanguíneo) e as "quentes" (vermelho) representam presença e intensidade de movimento (isto é, fluxo sanguíneo). Se há mais ou menos movimento de hemácias em um determinado local, haverá mais ou menos fluxo sanguíneo no mesmo (BAUER et al., 2006). O animal será anestesiado com uma solução de ketamina (150mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal). Um anel de plástico rígido preto é colocado sobre a pele do camundongo rodeando a área do implante(figura 4). O animal é devidamente posicionado para a medida do fluxo através de um feixe de laser que capta movimento das hemácias que fluem dentro dos vasos sanguíneos. O equipamento de laser Doppler (MoorLDI2-HR, Inglaterra) foi utilizado para o monitoramento não-invasivo (e sem contato físico) da circulação sanguínea, permitindo a avaliação do fluxo sanguíneo da microcirculação recém formada dentre a matriz de esponja implantada na região subcutânea dos camundongos. Os valores relativos de fluxo sanguíneo intrainplante serão obtidos por

análise de densidade espectral através do software moorLDI V5.0.

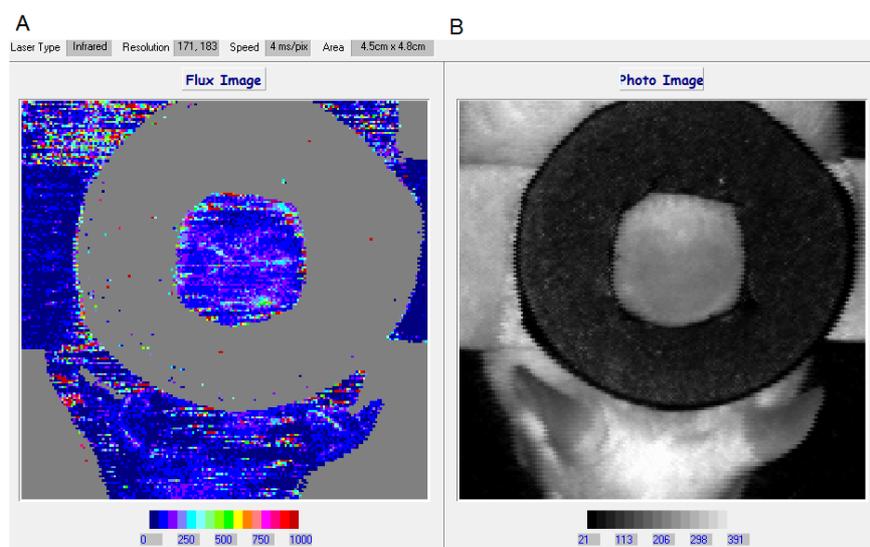


Figura 4: Foto representativa da avaliação do fluxo sanguíneo da micro circulação recém formada na região da esponja implantada no animal anestesiado pelo Laser Doppler (MoorLDI2-HR, Inglaterra).

4.3.2. Dosagem de Hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intrainplante quantifica indiretamente a neovascularização presente nos tecidos e tem sido utilizada como índice de vascularização em modelos de angiogênese. Esta técnica utiliza o método do reagente de Drabkin (DRABKIN & AUSTIN, 1932).

Os discos de esponja dos animais foram pesados e homogeneizados em 2mL de reagente de Drabkin (Labtest). Em seguida, foram centrifugados a 4° C a 1200 x G por 40 min. Após centrifugação, 200 µL dos sobrenadantes foram filtrados em membranas de porosidade de 0,22 µm (Millipore) e colocados em placas com 96 poços.

A leitura é realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina foi determinada por comparação a uma curva padrão. Os resultados obtidos foram expressos em concentração de hemoglobina microgramas por miligramas de peso úmido do implante (FERREIRA et al., 2004).

4.3.3. Dosagem de VEGF

O fator de crescimento endotelial vascular é um dos fatores mais críticos e específicos que induz várias funções endoteliais ligadas à angiogênese, incluindo migração e proliferação das células endoteliais, responsáveis pela cicatrização do tecido, sendo então um importante marcador a ser avaliado (KROLL et al., 2009; ZHANG et al., 2011).

Para a determinação desta citocina nos implantes foram utilizados 100 µL do sobrenadante restante da dosagem de hemoglobina.

Na realização do ensaio, foi utilizada placa de ELISA estéril. No primeiro dia diluições, foram adicionados 100µL de anticorpo monoclonal específico de captura. A placa foi vedada e colocada em câmara escura e úmida a 4°C *overnight*. Após remover o líquido remanescente por lavagem, foram adicionados- 300µL de tampão de bloqueio, esta placa foi então incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Ao término desta incubação, e, o conteúdo foi removido, e, em seguida, adicionou-se à placa o branco, os padrões e as amostras (100µL). No terceiro dia 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 min de incubação com 50 µL de ácido sulfúrico (2 M) e a intensidade da cor foi quantificada a 490 nm em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos como picogramas de citocina por mg de peso úmido.

4.3.4. Quantificação da densidade vascular

Para examinar o grau de vascularização no implante de esponja dos grupos de camundongos tratados ou controles, os implantes foram processados para análise

histológica. Os mesmos foram coletados em formol tamponado a 10% por no mínimo 48 horas e processados para a inclusão em parafina, embebidos em parafina. As secções de 5 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas em microscópio. Imagens microscópicas das secções foram obtidas com lente objetiva planopolicromática 40x. As imagens foram digitalizadas através de micro-câmera JVC TK-1270/JGB e transferidas para um analisador de imagem (Kontron Eletronics, Carl Zeiss-KS300 versão 2). Microvasos com lúmen contendo células vermelhas foram considerados para contagem ou não. A fim de estabelecer o mínimo campo microscópico representativo por amostra, vasos sanguíneos foram contados em 50 campos (magnificação de 400x) de um slide aleatório em cada grupo como descrito previamente (MORO et al, 2003). Os resultados foram expressos como mean ± SEM do total de número de vasos por campo.

4.4. Avaliação de marcadores inflamatórios

4.4.1. Dosagem de nitrito

O Óxido de óxido nítrico (NO) desempenha um papel numa variedade de funções fisiológicas, incluindo circulação e pressão sanguínea, função plaquetária, defesa do hospedeiro, e neurotransmissão no sistema nervoso central e nervos periféricos (KORHONEN, 2005).

A quantificação do NO em meios biológico é difícil devido a sua meia-vida curta (6 a 10 segundos) e a sua baixa concentração, por isso quantificam-se os seus metabolitos estáveis: Nitrito e Nitrato (RALSTON 1997, STICHTENOTH & FRÖLICH 1998, MIRANDA et al., 2001, SPRENG et al., 2001, ERSOY et al., 2002). O nitrito é o único produto estável

resultante da auto-oxidação de NO em soluções aquosas e tecidos o que o torna um ótimo parâmetro de medição indireta das concentrações de NO em nosso modelo.

A análise produção de nitrito foi feita pela reação de Griess como uma medida indireta da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982; LI et al., 1991). Para tanto, 100 µL do sobrenadante para a dosagem de hemoglobina foi colocado em duplicata uma placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (sulfanilamida 1% e naitiletilenediamina 0,1% em 2% de ácido fosfórico; Sigma-Aldrich) nas amostras e na curva padrão. A absorbância será medida em leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de nitrito foi determinada através da comparação com uma curva utilizando como padrão uma solução de nitrito de sódio e os resultados expressos em µg/ml por grama de tecido úmido.

4.4.2. Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A peroxidase é uma enzima encontrada em leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Os neutrófilos secretam três vezes mais MPO (mieloperoxidase: a peroxidase do neutrófilo) que os mononucleares (KRAWISZ et al., 1984). A mieloperoxidase é um importante agente bactericida que cataliza a formação de hipoclorito a partir de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e cloreto (SUZUKI et al., 1983; SORENSEN et al., 1999). A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação sendo uma técnica que possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (CROSS et al., 2003; MULLANE et al., 1985).

Inicialmente, metade da esponja retirada do sobrenadante da dosagem de hemoglobina foi adicionada a 2mL de tampão fosfato de sódio (pH 4,7) contendo 0,1 M

NaCl, 0,02 M NaPO₄ e 0,015 M de NaEDTA, e centrifugadas a 11000 x G durante 30 minutos. A uma alíquota do sobrenadante (200 µL) foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo hexa-1,6-bisdeciltrimetilammônio (HTAB). A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada através da mudança de absorbância (densidade óptica; OD) a 450nm utilizando 100µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração final de 1,6 mM e 100 µL de substrato H₂O₂ na concentração final de 0,3 mM, diluída 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.

4.4.3. Análise da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Esta técnica é utilizada para quantificar a infiltração destas células nos sítios inflamatórios (BAILEY, 1988). A atividade de NAG baseia-se na hidrólise do r-nitrofenil-N acetil-β-D-glicosamina (substrato) pela N-acetil-β-D-glicosaminidase liberando r-nitrofenol (FERREIRA, 2007). A quantificação de células mononucleares nos implantes de esponjas pode ser feita avaliando-se a atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), presente em altos níveis em lisossomas de macrófagos ativados (BELO et al., 2004).

Metade da esponja retirada do sobrenadante da dosagem de hemoglobina foi homogeneizada em uma solução de NaCl (0,9% wv-1) contendo 0,1% v/v-1 Triton X-100 e centrifugado (3000 x G; 10 min 4°C), por 10 minutos. Alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram, então, incubadas com 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminida, preparado em tampão de citrato-fosfato (pH 4,5) com concentração final de 2,34 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH

10,6).

Para a realização do ensaio, foi adicionado 100 μL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 μL do substrato (*p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase), 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 0,2 M (pH 10,6). A absorbância será medida por leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol/ml^{-1} por grama de tecido úmido.

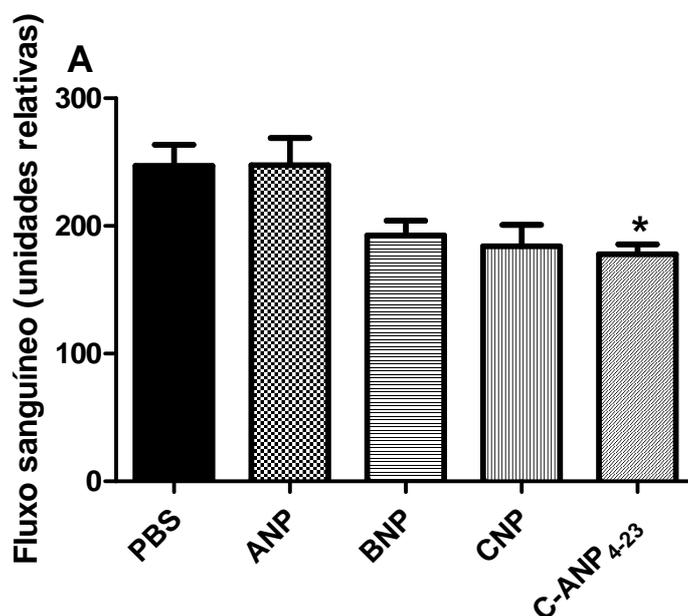
4.5. *Análise estatística*

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Comparações entre os grupos 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.

5. Resultados

5. Resultados

Os resultados da primeira série de experimentos mostraram que uma dose única de C-ANP₄₋₂₃ (200ng/implante), mas não o ANP, ou BNP ou CNP, foi capaz de inibir significativamente o componente angiogênico do tecido fibrovascular nos implantes avaliados e retirados no quarto dia após implantação, como mostrado pela medida do fluxo sanguíneo por *Laser Doppler Fluometry* (LDF) nos implantes. Os resultados mostraram que apenas o C-ANP₄₋₂₃, mas não o ANP, o BNP ou o CNP apresentou uma redução significativa do fluxo sanguíneo comparado ao grupo controle (Figura 5A). Comprovada a efetividade deste peptídeo uma curva dose resposta foi realizada, mostrando novamente que de fato, a dose de 200ng foi a única eficaz de reduzir significativamente os valores de fluxo sanguíneo (Figura 5B).



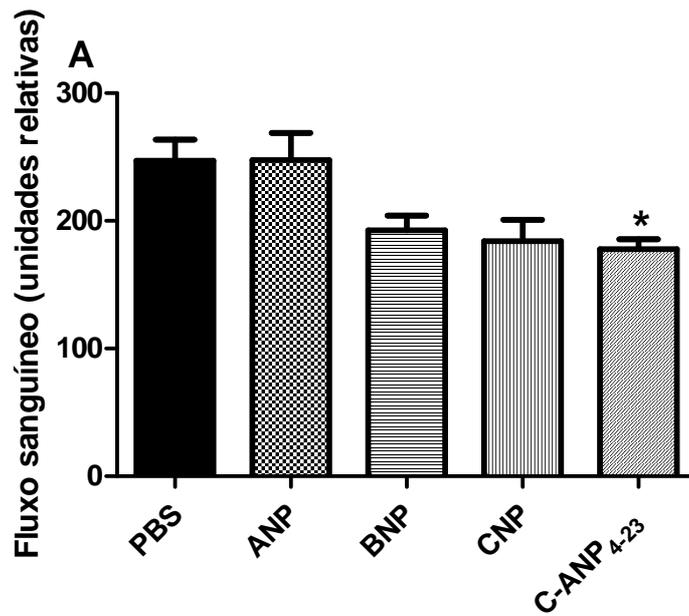
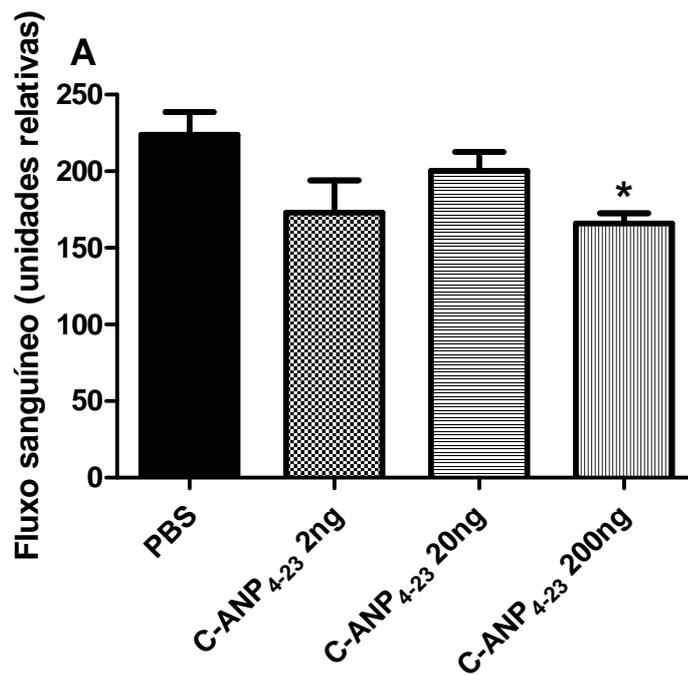


Figura 5A: Avaliação do fluxo sanguíneo pelo laser Doppler das esponjas com 4 dias após implantação em animais anestesiados. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.



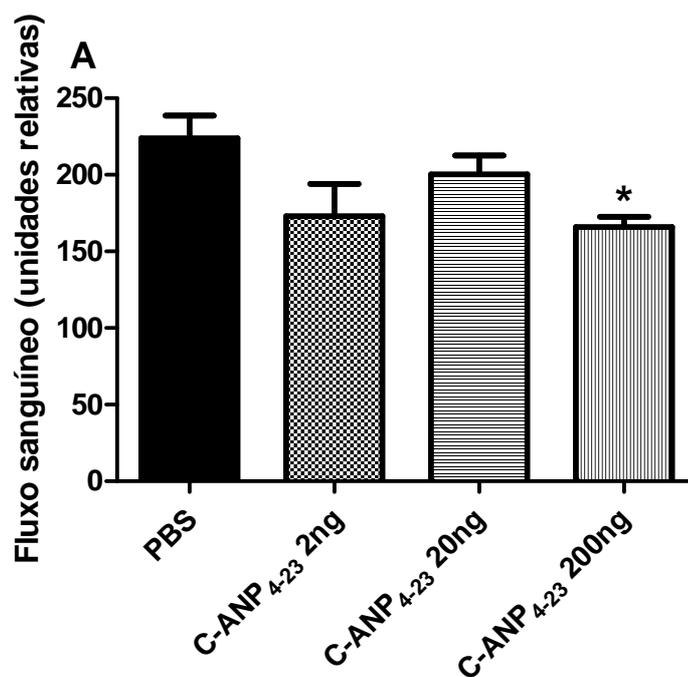


Figura 5B: Curva dose resposta para avaliação do fluxo sanguíneo pelo laser Doppler nas esponjas com 4 dias após implantação em animais anestesiados. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 2, 20 e 200ng de peptídeo. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença significativa entre o grupo tratado com 200ng de C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

Para corroborar os resultados da análise funcional do efeito anti-angiogênico do peptídeo, foi realizada a análise do conteúdo de hemoglobina intra-implantes. Na figura 6A, o conteúdo de Hb foi reduzido aproximadamente 25% depois do tratamento com C-ANP₄₋₂₃. Após ter estabelecido o efeito antiangiogênico do C-ANP₄₋₂₃ (200ng/ implante) pelo conteúdo de hemoglobina, uma curva dose resposta deste peptídeo foi realizada. Os resultados mostraram que a dose antiangiogênica mais efetiva foi de fato a de 200ng/ implante (fig. 6B).

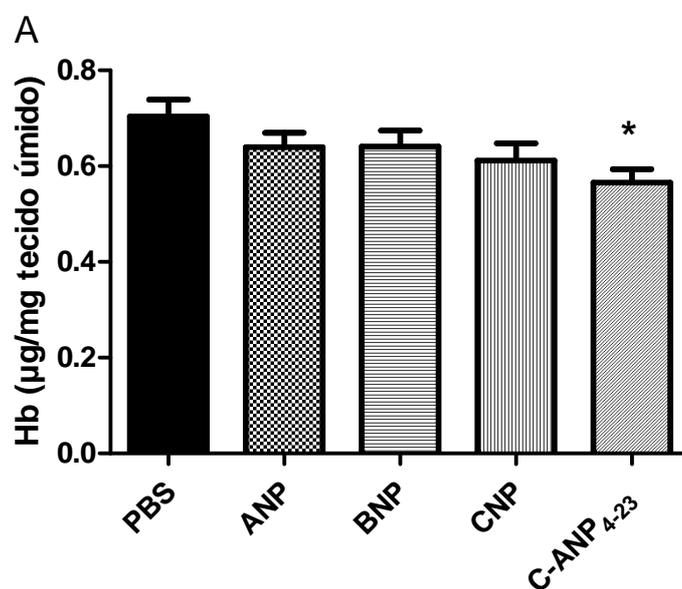
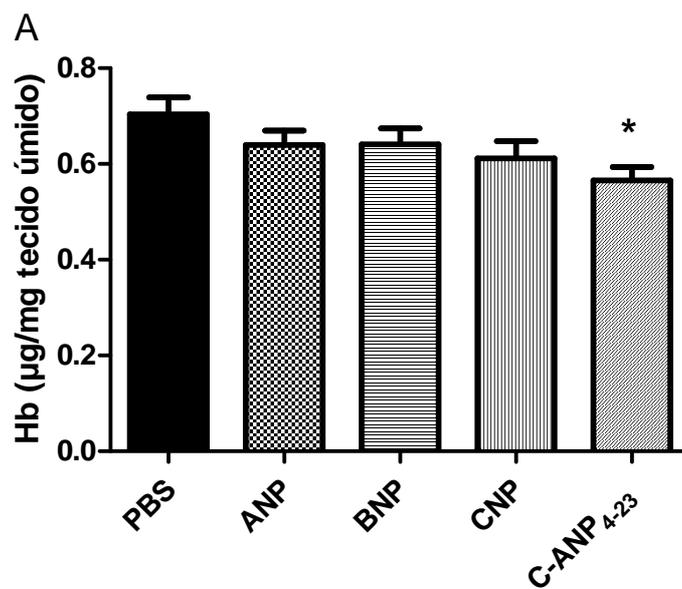


Figura 6A: Conteúdo de hemoglobina nas esponjas retiradas quatro dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 µl de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo intrainplante. Os valores representam as médias ± e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

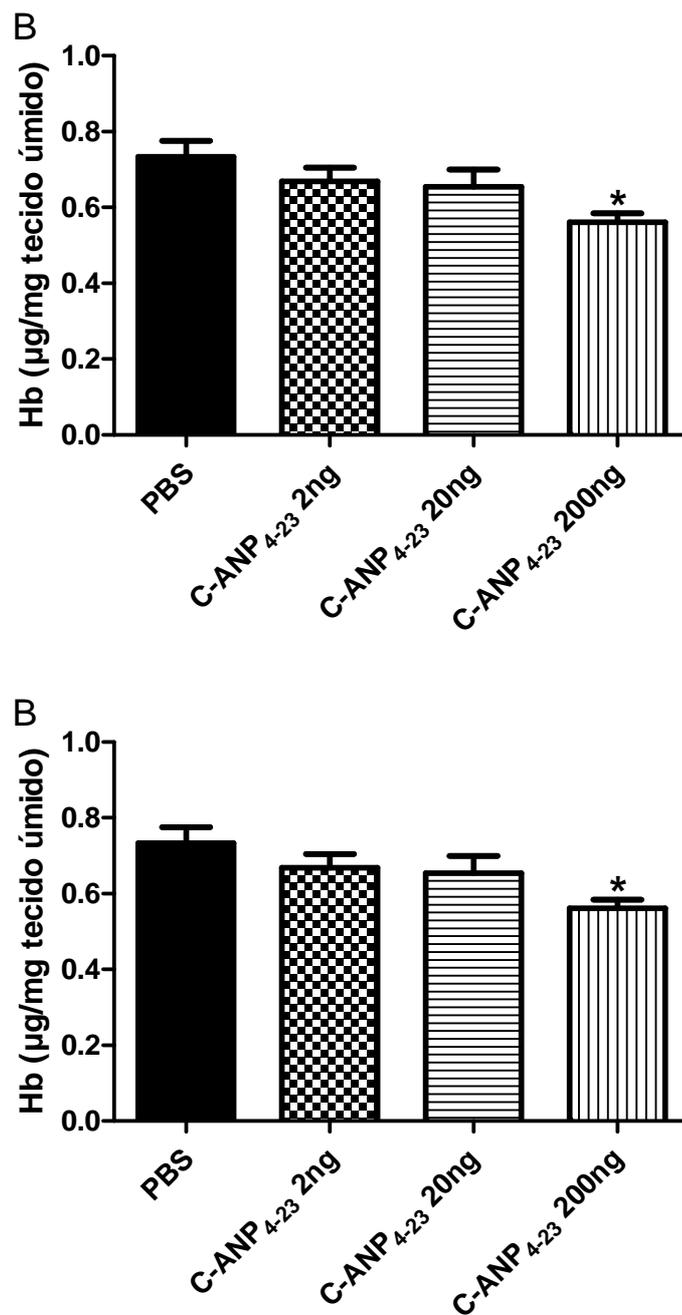


Figura 6B: Curva dose-resposta para conteúdo de hemoglobina das esponjas retiradas quatro dias após o implante. O grupo controle recebeu 40 µl de PBS e os grupos tratados receberam 2, 20 e 200ng de C-ANP₄₋₂₃ intrainplante. Os valores representam as médias ± e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença significativa entre o grupo tratado com 200 ng de C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

A análise da produção de VEGF (fator de crescimento pró angiogênico envolvido na permeabilidade vascular, migração e proliferação das células endoteliais) nos implantes revelou que o C-ANP₄₋₂₃ foi o único peptídeo capaz de aumentar

significativamente a produção dessa citocina, e que a dose de 200ng foi a única eficaz de alterar significativamente seu nível (Fig. 7A e B).

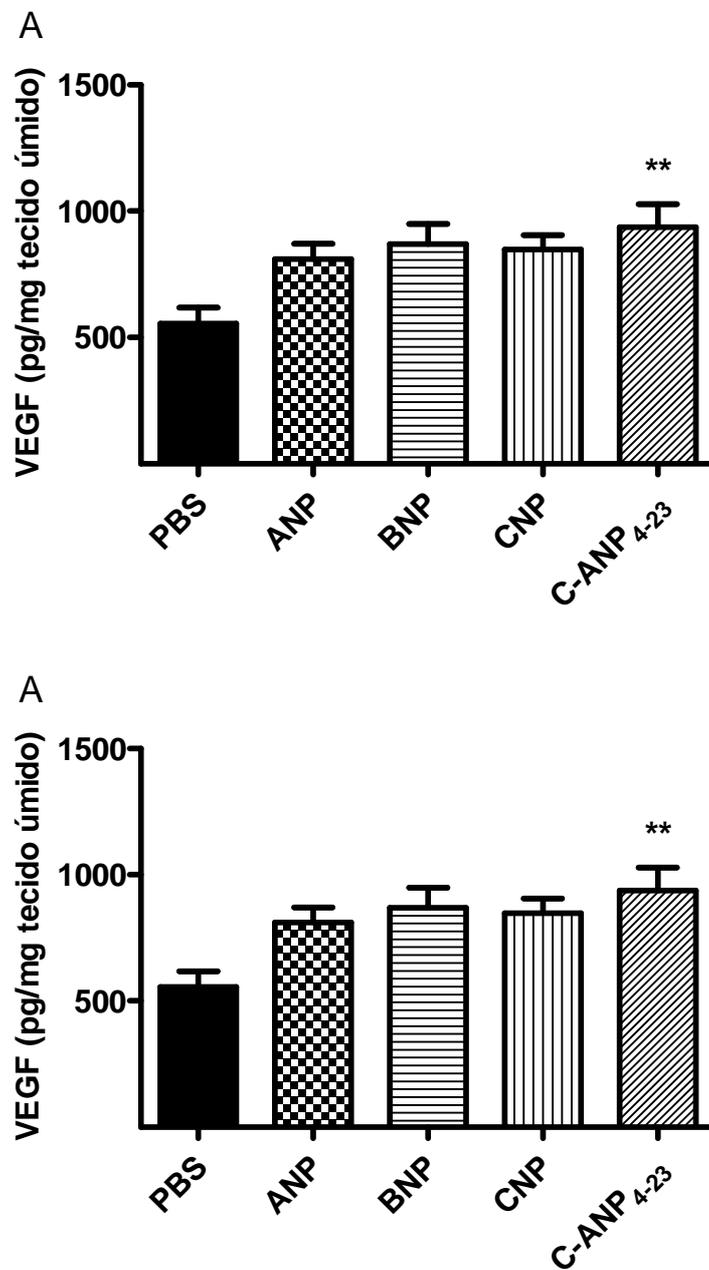


Figura 7A: Avaliação dos níveis de VEGF nas esponjas tratadas e retiradas quatro dias após o implante. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo intraimplante. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * p <0,01. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

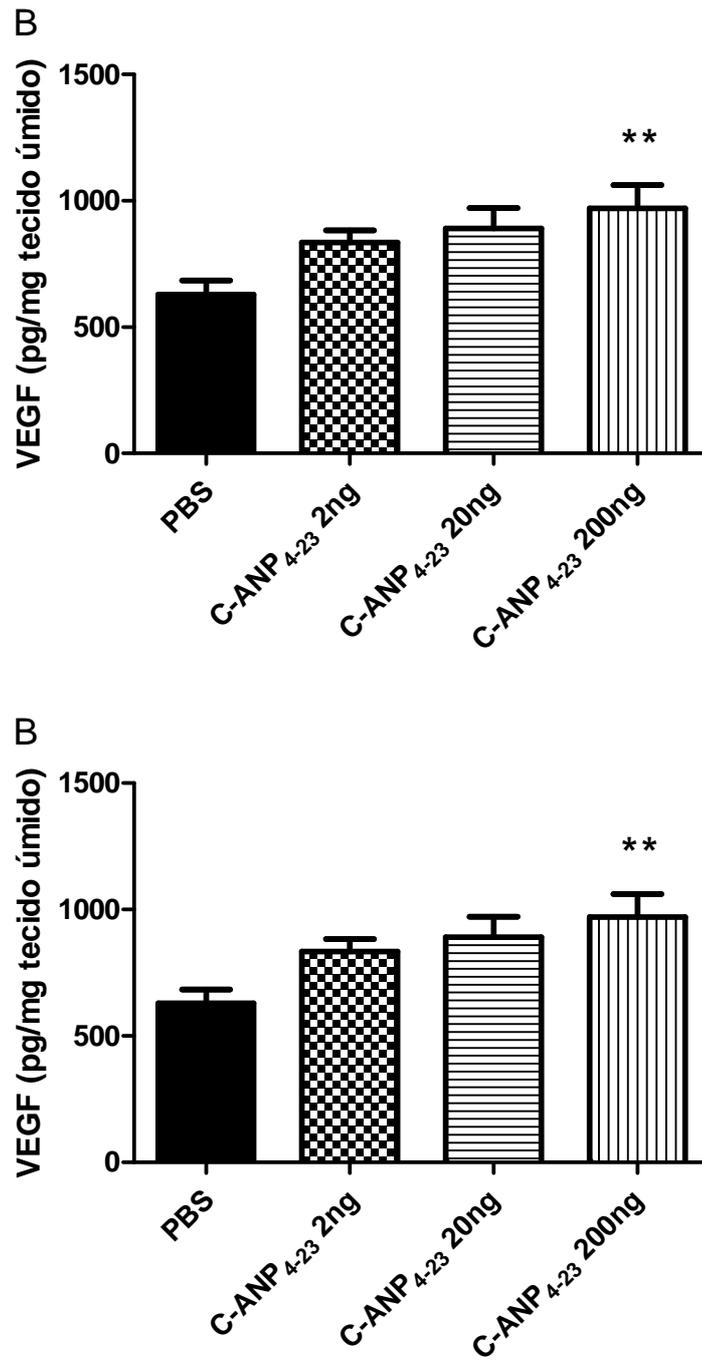


Figura 7B: Curva dose-resposta dos níveis de VEGF nas esponjas tratadas e retiradas quatro dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 2, 20 e 200ng de peptídeo intrainplante. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,01$. Diferença significativa entre o grupo tratado com 200ng de C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

O Óxido de óxido nítrico (NO) é um mensageiro difusível que desempenha um papel numa variedade de funções fisiológicas, incluindo a relaxamento de vasos sanguíneos, a inibição da agregação de plaquetas, a inflamação, a neurotransmissão, a

diferenciação celular, a migração e a apoptose (KORHONEN, 2005)

Tendo em vista uma provável participação dos NPs na produção de óxido nítrico (NO), nós avaliamos o efeito destes peptídeos na produção de nitrito (metabólito estável do NO). Foi mostrado que apenas o C-ANP₄₋₂₃ diminuiu significativamente os níveis de nitrito nos implantes tratados com o mesmo peptídeo e que a dose de 200ng foi a única eficaz de alterar significativamente seu nível (Fig. 8A e B).

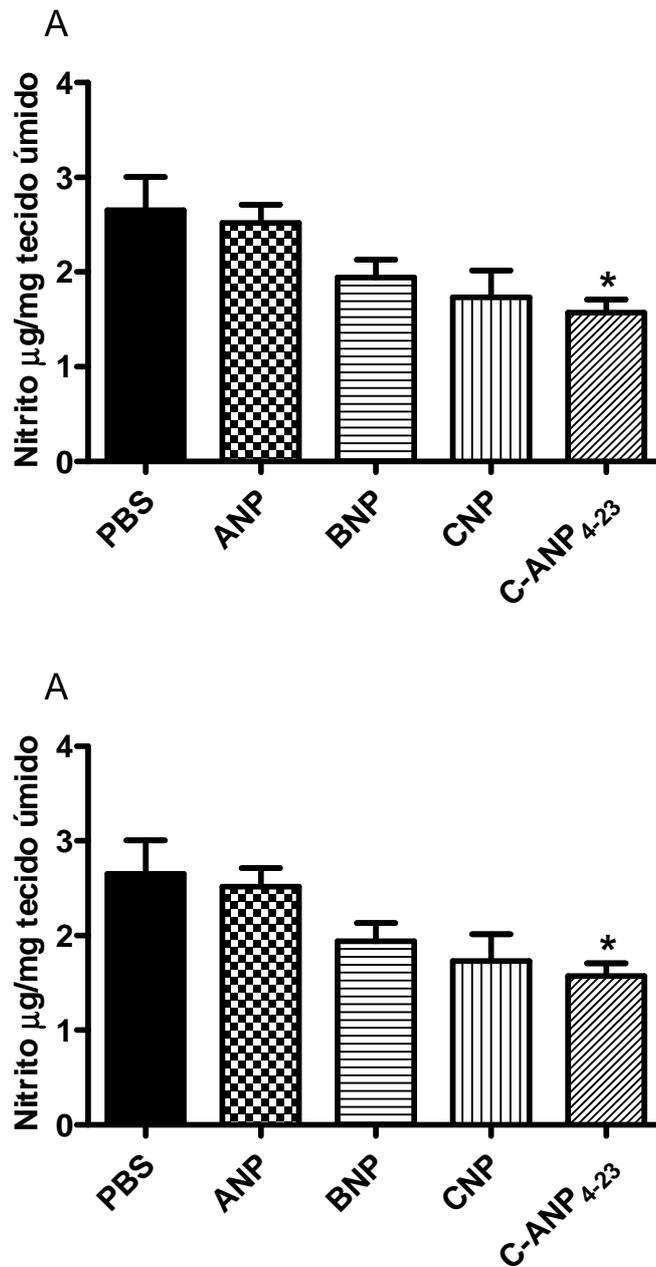


Figura 8A: Avaliação dos níveis de nitrito nas esponjas tratadas e retiradas quatro dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 µl de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo intrainplante. Os valores representam as médias ± e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença

significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

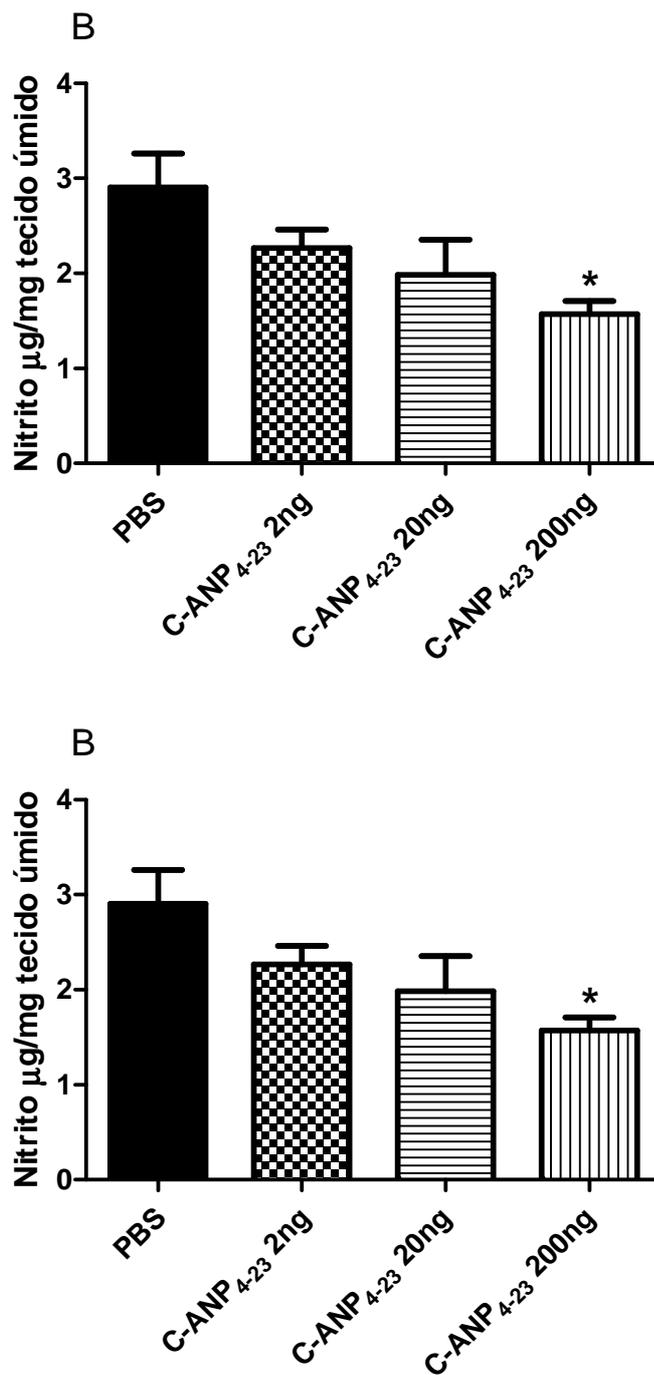


Figura 8B: Curva dose-resposta dos níveis de nitrito nas esponjas tratadas e retiradas 4 dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 µl de PBS e os grupos tratados receberam 2, 20 e 200ng de peptídeo. Os valores representam as médias ± e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * $p < 0,05$. Diferença significativa entre o grupo tratado com 200ng de C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

Os tratamentos com PNs foram incapazes de modular os níveis de enzimas com atividade inflamatórias mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glicosaminidase intra implante (Fig 9A e B, 10A e B).

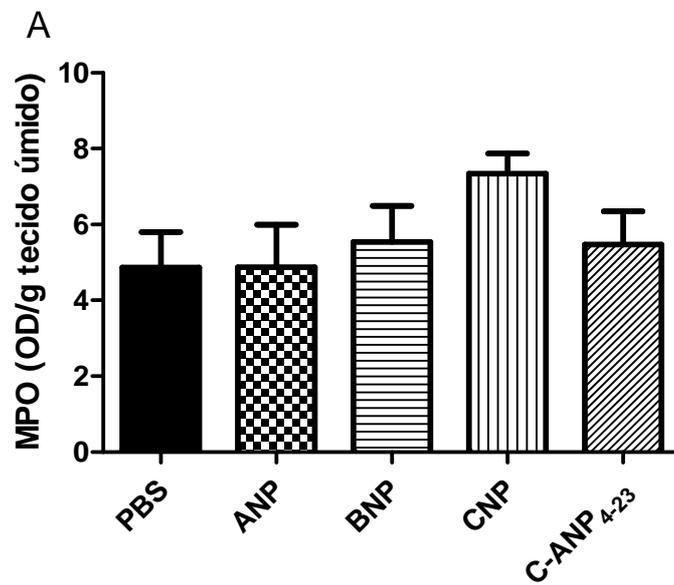
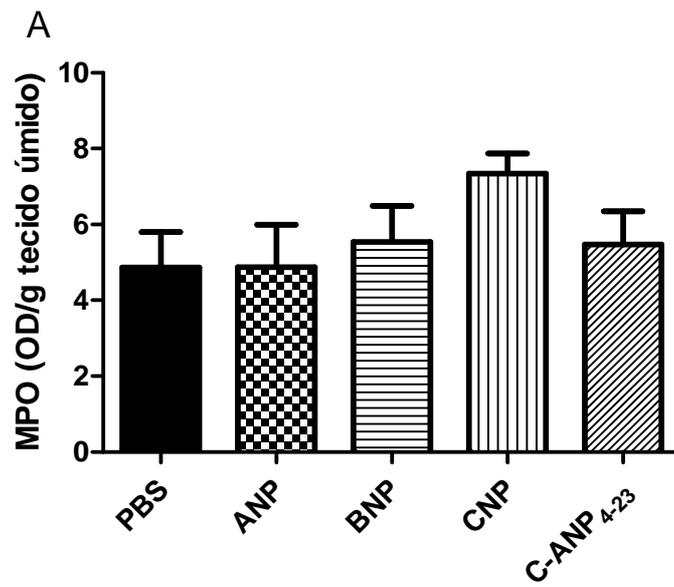


Figura 9A: Avaliação dos níveis de MPO nas esponjas tratadas e retiradas quatro dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo. Não obteve diferença significativa.

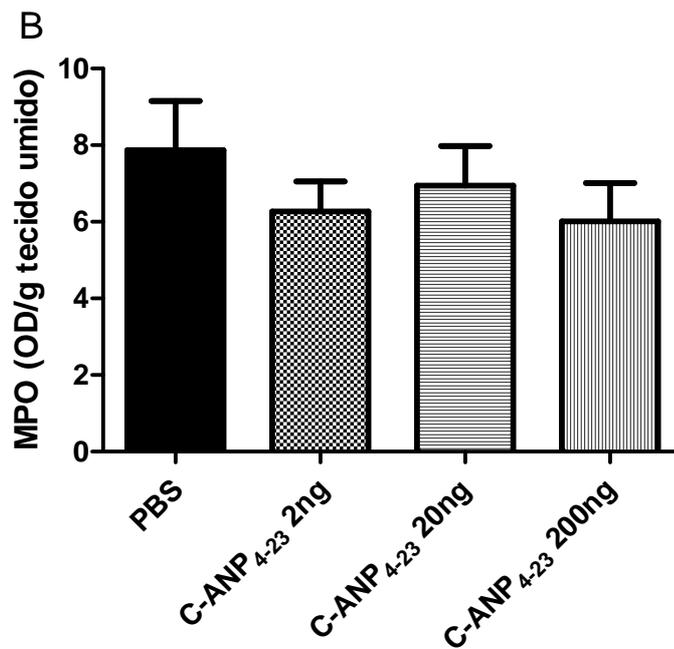
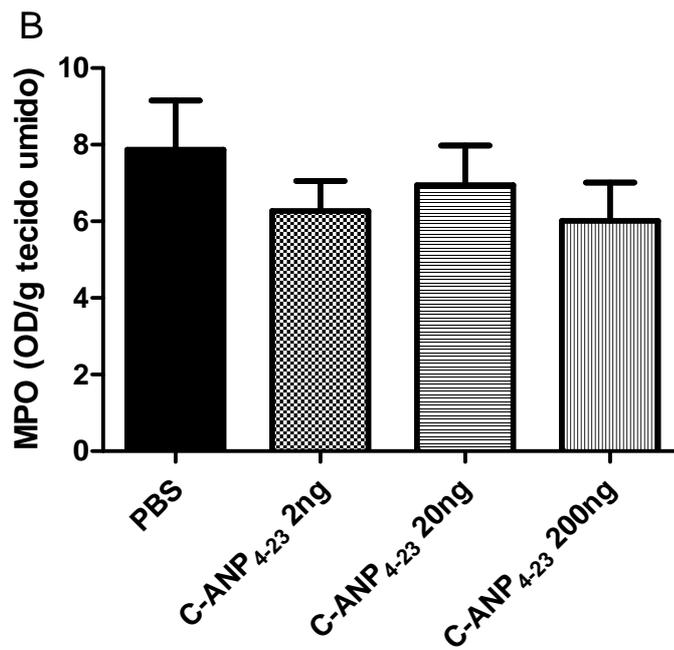


Figura 9B: Curva dose-resposta dos níveis de MPO nas esponjas tratadas e retiradas 4 dias após o implante. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 2, 20 e 200ng de peptídeo. Não obteve diferença significativa.

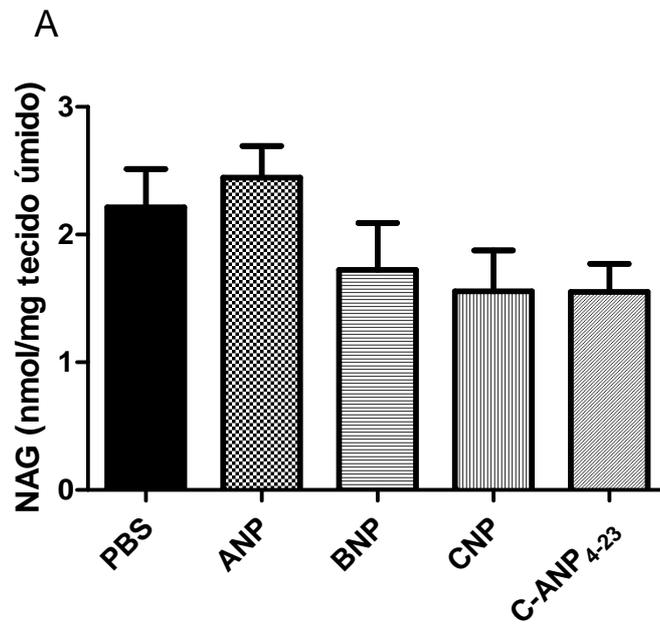
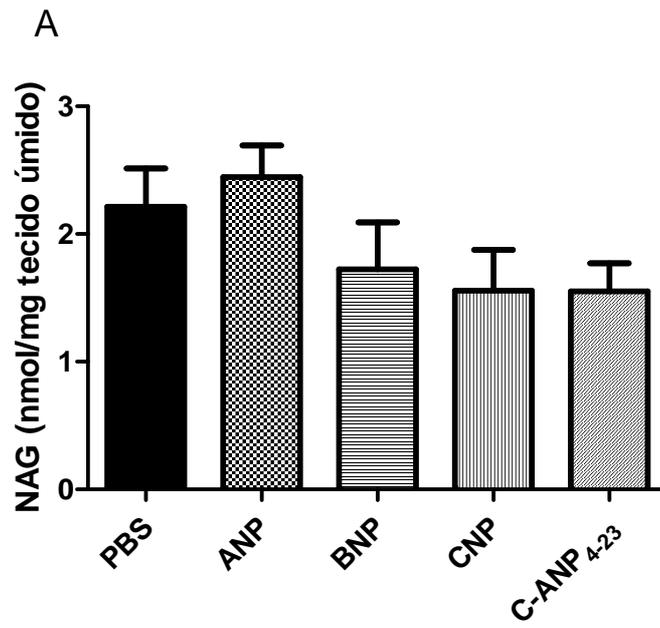


Figura 10A: Avaliação dos níveis de NAG nas esponjas tratadas e retiradas 4 dias após o implante. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo. Não obteve diferença significativa.

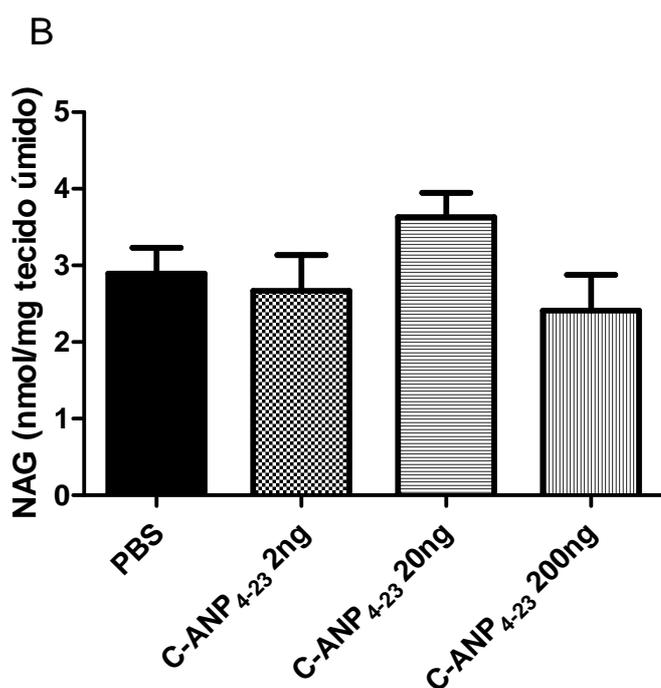
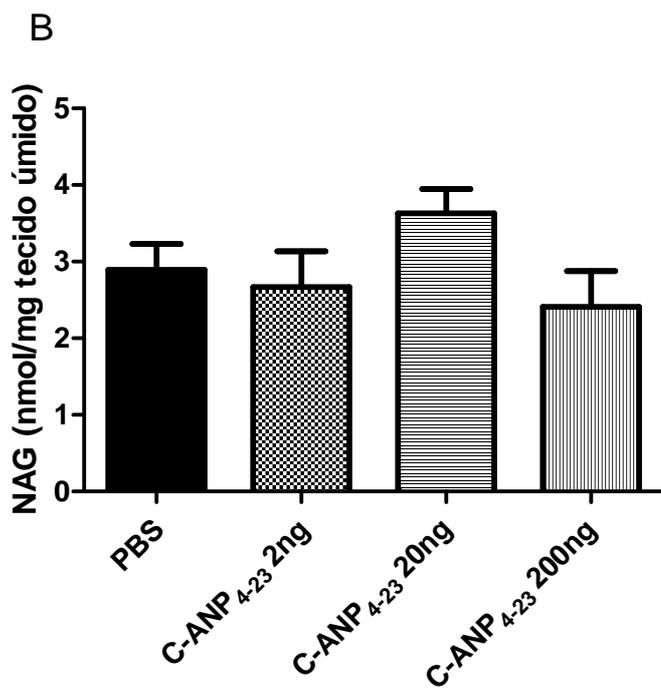


Figura 10B: Avaliação dos níveis de NAG nas esponjas tratadas e retiradas quatro dias após a implantação. O grupo controle recebeu 40 μ l de PBS e os grupos tratados receberam 200ng de peptídeo. Não obteve diferença significativa.

Outra série de experimentos foi realizada para determinar a duração dos efeitos de única ou múltipla dose do peptídeo. O protocolo consistiu de injeções diárias por cinco dias consecutivos de C-ANP₄₋₂₃ (200ng/ implante) injetadas intra-implante e os parâmetros

angiogênicos analisados no dia 7 pós-implantação. Os resultados mostraram que os efeitos de uma dose única não durou até 7 dias. No entanto os efeitos anti-angiogênicos, diminuição do conteúdo de hemoglobina e fluxo sanguíneo foram observadas nos implantes tratados com 200ng/implante C-ANP₄₋₂₃ por 5 dias consecutivos e retirados com 7 dias (Fig. 11A, B e C).

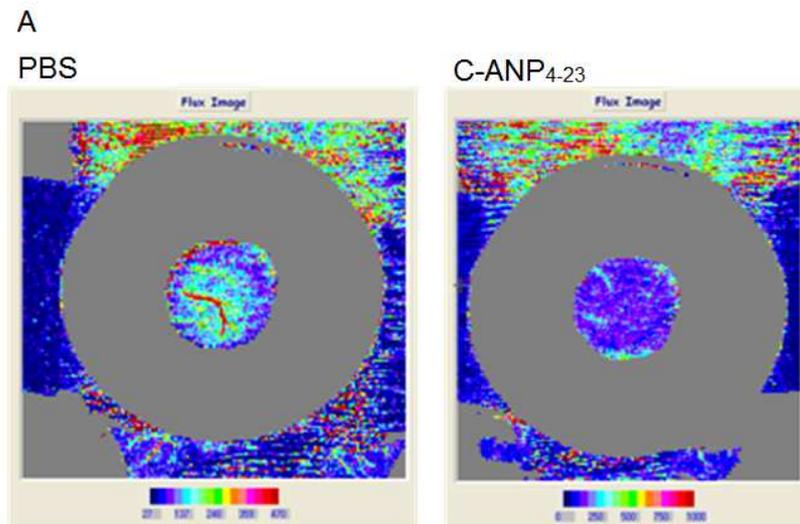


Figura 11A: Imagens do software moorLDI V5.0 feita no animal controle (tratado com 40 μ l de PBS) e no animal tratado com C-ANP₄₋₂₃ 200ng intrainplante por 5 dias consecutivos para avaliação do fluxo sanguíneo na matriz de esponja implantada nos animais anestesiados após 7 dias.

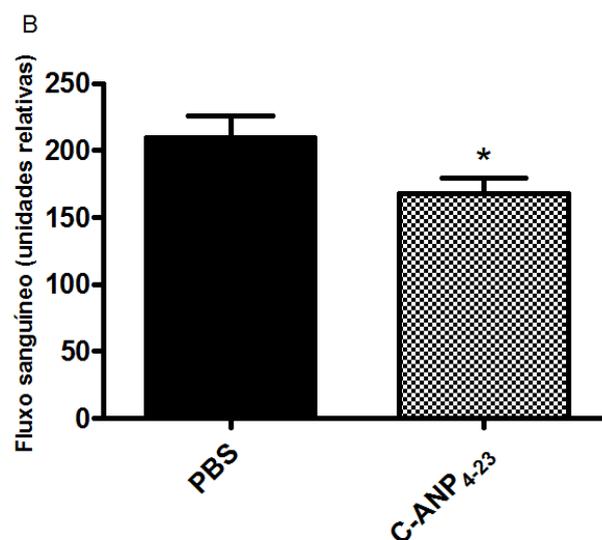


Figura 11B: Análise do fluxo sanguíneo pelo laser Doppler dos implantes em camundongos anestesiados tratados com dose 200 ng de C-ANP₄₋₂₃ intrainplante por 5 dias consecutivos e grupo controle com 40 μ l de PBS 7 dias após a implantação. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. * p <0,05. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo

controle.

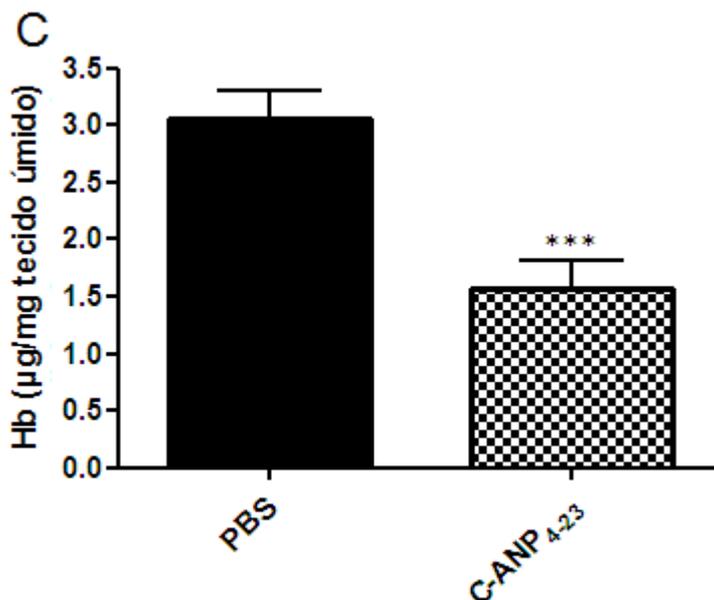


Figura 11C: Análise do conteúdo de hemoglobina nos implantes tratados com dose de 200 ng C-ANP₄₋₂₃ intrainplante por 5 dias consecutivos e grupo controle com 40µl de PBS retirados 7 dias após implantação. Os valores representam as médias ± e.p.m de grupos de 12 animais em cada grupo. *** $p < 0,001$. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

O tratamento prolongado com dose de 200ng C-ANP₄₋₂₃ intrainplante por 5 dias consecutivos foi capaz de manter níveis baixos de nitrito intra implante. Neste caso o peptídeo diminuiu significativamente os níveis de VEGF (Tabela 3).

Tratamento	Conteúdo de Hb (µg/mg tecido úmido)	Nitrito (mg/g tecido úmido)	VEGF (pg/mg tecido úmido)
PBS	2,40± 0,2	4,54±0,50	282± 40
Única dose (200ng)	2,47±0,3	4,30±0,45	352±40
Múltiplas doses	1,0±0.2***	3,02± 0,32*	223±55*

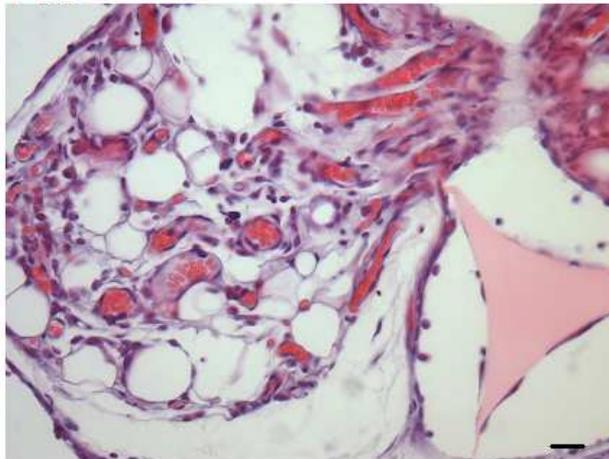
Tabela 3: Efeito do C-ANP₄₋₂₃ sobre do conteúdo de hemoglobina, níveis de nitrito e níveis de VEGF de esponjas retiradas 7 dias após implatação tratadas com 200ng intrainplante dose única ou por cinco dias

consecutivos. Hb=Hemoglobina, VEGF= fator de crescimento vascular periférico. Os valores representam média \pm e.p.m de grupos com 12 animais cada. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

A fim de corroborar com os parâmetros bioquímicos e funcionais indicativos de atenuação da angiogênese pelo peptídeo, secções histológicas de implantes de 7 dias tratados com dose de 200ng intrainplante do peptídeo por 5 dias consecutivos foram realizadas. As análises morfométricas dos implantes mostraram uma diminuição do número de vasos sanguíneos no grupo tratado com o peptídeo comparado com o grupo de implantes tratados com PBS. (Fig. 12A, B e C).

A

PBS



B

C-ANP₄₋₂₃

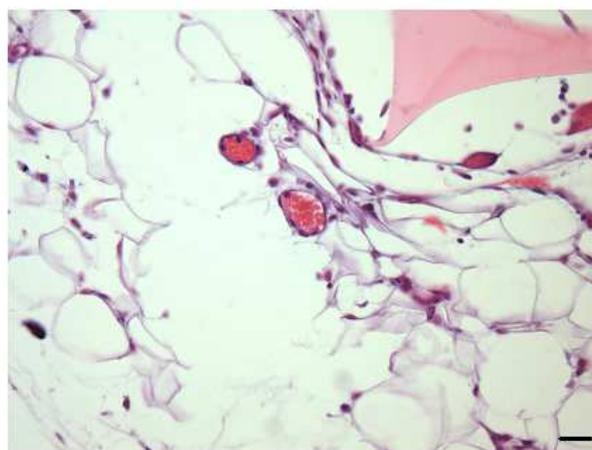


Figura 12 A e B: Secções histológicas das esponjas tratadas com dose de 200ng do peptídeo intrainplante

por 5 dias consecutivos e retiradas com 7 dias coradas com hematoxilina e eosina no aumento de 40x. Visualização da matriz sintética da esponja e de vasos sanguíneos. Figura A animal controle, e figura B animal tratado com dose de 200ng intrainplante por 5 dias consecutivos de C-ANP₄₋₂₃.

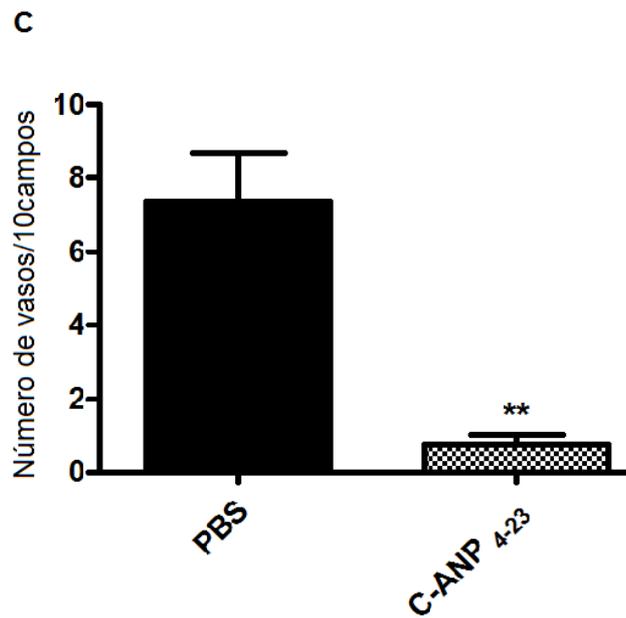


Figura 12C: Contagem dos vasos sanguíneos em secções histológicas da matriz sintética de esponja tratada com dose de 200ng de C-ANP₄₋₂₃ intrainplante por cinco dias consecutivos e grupo controle com PBS. ** $p < 0,01$. Diferença significativa entre o grupo tratado com C-ANP₄₋₂₃ em relação ao grupo controle.

6. Discussão

6. Discussão

Além de suas ações biológicas clássicas controlando sódio, água e homeostase da pressão sanguínea, os peptídeos natriuréticos são implicados no crescimento tecidual e angiogênese (ANAND-SRIVASTAVA, 2005; ANDALOUSI et al. 2013). No presente estudo, nós investigamos os efeitos do ANP, do BNP, do CNP e do C-ANP₄₋₂₃ sobre os componentes angiogênicos e inflamatórios do tecido fibrovascular induzido por implantes de matriz sintética de poliéter-poliuretano em camundongos. Como avaliado por uma combinação de parâmetros funcionais, bioquímicos e histológicos nós mostramos que C-ANP₄₋₂₃, mas não o ANP, o BNP ou o CNP inibiu angiogênese inflamatória induzido pela matriz sintética.

Na formação de tecido fibroproliferativo, a angiogênese e inflamação co-existem e estão associadas com um número de processos fisiológicos (reparo tecidual, lactação) e patológicos (inflamação crônica e crescimento tumoral). Nós não encontramos relatos dos efeitos dos PNs nesses eventos biológicos induzidos por implante de matriz sintética. Esta técnica induz uma resposta angiogênica inflamatória similar a que ocorre depois de uma injúria mecânica (angioplastia, feridas cirúrgicas) ou natural (aterosclerose, inflamação crônica) (MENDES et al., 2009; LARA-CASTILLO et al., 2009). O modelo proporciona um microambiente cronicamente inflamado em que cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado (ANDRADE *et al.*, 1997; BELO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2006).

Primeiramente foi avaliado o fluxo sanguíneo pela técnica de imagem de perfusão por laser Doppler (MoorLDI-2, Inglaterra). Além de ser um bom método para avaliar o fluxo sanguíneo da microcirculação recém formada é considerada uma técnica não invasiva.

Além disso, a infiltração vascular dos implantes foi avaliada pelo método de

dosagem de hemoglobina (DRABKIN & AUSTIN, 1932) adaptado por PLUNKETT & HAILEY (1990) para avaliar a atividade angiogênica. Dessa maneira, a dosagem do conteúdo de hemoglobina foi utilizada como índice indireto para a avaliação da vascularização nos implantes. O efeito anti-angiogênico do C-ANP₄₋₂₃, visto pela diminuição do fluxo sanguíneo e do conteúdo de hemoglobina, administrado como única dose de 200ng intrainplante e avaliado após 4 dias ou dose de 200ng intrainplante por 5 dias consecutivos e avaliados após 7 dias aqui apresentados estão de acordo com vários relatos que demonstraram a ação inibitória de outros peptídeos natriuréticos em diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*. Pedran e col. 1997 mostraram que os PNs inibiram proliferação e migração de células endoteliais em ensaios *in vitro* (PEDRAM, RAZANDI, HU e LEVIN, 1997) e Lara-Castillo e col. 2011 demonstraram a capacidade do ANP em reduzir o extravasamento vascular e neovascularização coroidal em migração *in vivo* de células endoteliais. Corroborando com as atividades indicativas do efeito anti-angiogênico dos peptídeos endógenos, estudos também mostraram que o C-ANP₄₋₂₃, o agonista sintético seletivo do receptor tipo C, foi capaz de diminuir o aumento da proliferação de células do músculo liso vascular em ensaios *in vivo* e *in vitro* em ratos espontaneamente hipertensos, que pode estar relacionado a um efeito anti-angiogênico (ANDALOUSI, LI, ANAND-SRIVASTAVA, 2013).

Em contraste marcante com nossos achados, tem sido mostrado que os PNs atuam na estimulação da angiogênese por estimular a formação de novos vasos sanguíneos em coração hipertrófico de rato e em isquemia de membros posteriores (KUHN et al., 2009). Além disso, foi mostrado que o BNP promove o crescimento vascular por aumentar o número de progenitores endoteliais e aumentar sua propriedade funcional (Xi et al., 2011).

É possível que não apenas o modelo experimental usado, mas também as concentrações dos peptídeos utilizados contribuíssem para os diferentes resultados

encontrados em nossos experimentos em relação aos de outros pesquisadores. De fato, as concentrações 10^{-6} M que promoveram inibição da proliferação e migração das células endoteliais foram muito maiores que aquelas que promoveram estimulação da angiogênese *in vivo* e *in vitro* (10^{-8} M) (YAMAHARA & ITOH, 2009).

Além disso, também foi avaliado em nosso estudo os níveis intra-implante de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A citocina VEGF atua de maneira autócrina ou parácrina e pode estimular angiogênese agindo diretamente sobre os receptores no endotélio ou indiretamente atraindo e/ou ativando células acessórias (ex. leucócitos) que, por sua vez, irão produzir mais fatores angiogênicos. Além disso, essa citocina pode atuar na indução do crescimento do novo vaso sanguíneo (LIEKENS et al, 2001).

Interessantemente, em nossos experimentos os níveis de VEGF aumentaram nos implantes tratados com dose única C-ANP₄₋₂₃ e retirados após 4 dias. Isto está em contraste com o trabalho publicado por Pedram *et al* (2001) (PEDRAM, RAZANDI and LEVIN, 2001) que demonstrou uma supressão do VEGF em células humanas e bovinas tratadas com os PNs. Uma possível explicação para esta discrepância possa ser que em um microambiente hipóxico dos implantes tratados, a produção de VEGF foi um tentativa de estimular a angiogênese. De fato, hipóxia, estresse oxidativo e citocinas são os principais fatores que regulam a expressão/produção de VEGF (MESSMER-BLUST, AN and LI, 2009). Também é possível que a discrepância possa ser atribuída a diferentes tipos de modelos experimentais usados *in vivo* e *in vitro*. Porém nossos resultados com múltiplas doses do C-ANP₄₋₂₃ estão de acordo com a literatura, pois foram capazes de diminuir os níveis intra-implante de VEGF, o que indica que a ação prolongada do C-ANP₄₋₂₃ na diminuição da angiogênese pode ser realmente pela via do VEGF, o que de fato está de acordo com Pedran e col. 1997.

Neste estudo, a investigação da atividade dos peptídeos natriuréticos na atividade inflamatória na matriz esponjosa foi realizada através da quantificação indireta da

atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase para a estimativa do acúmulo de neutrófilos e de macrófagos, respectivamente.

O recrutamento seletivo de leucócitos da circulação para o local lesado é um dos marcos da resposta inflamatória (BUTCHER, 1991), sendo os neutrófilos e os macrófagos as primeiras linhagens celulares a se acumularem nos sítios de lesão (FORD et al, 1989).

Ambas a enzimas estão presentes com alta atividade específica nos respectivos grânulos azurofílicos de neutrófilos e lisossomos de macrófagos ativados (BAILEY, 1988; KUEBER et al, 1996). Porém deve-se atentar para o fato de que neste estudo foram utilizadas técnicas bioquímicas para a detecção desses leucócitos, podendo essas técnicas não disporem de sensibilidade suficiente para a detecção do acúmulo de neutrófilos, apesar de apresentar uma forte correlação entre o número de neutrófilos e a atividade de MPO, como descrito por BRADLEY et al (1982).

Não foi mostrado em nosso estudo o efeito modulatório dos peptídeos natriuréticos nesses marcadores inflamatórios (atividade de enzimas inflamatórias) no modelo de implante de esponjas.

Esses achados estão em contraste com a ação dos PNs modulando eventos inflamatórios, em estudos que mostram que os PNs diminuem a infiltração de macrófagos, de proteína quimioatrativa de monócito-1 (MCP-1) e de uma molécula e pró-inflamatória, a tenascina-C (TN-C) em um modelo *in vivo* com ratos Wistar (FUGITA et al, 2013). É possível que a discrepância seja devido a diferenças animal/tecido e o modelo utilizado possa ter induzido um diferente ambiente inflamatório.

Foram avaliados também em nosso estudo os níveis de nitrito. A quantificação do NO em meios biológico é difícil devido a sua meia-vida curta (6 a 10 segundos e as suas baixas concentrações, por isso quantificam-se os seus metabólitos estáveis: Nitrito e Nitrato (RALSTON 1997, STICHTENOTH & FRÖLICH 1998, MIRANDA et al., 2001, SPRENG et al., 2001, ERSOY et al., 2002). O nitrito é o único produto estável resultante

da auto-oxidação de NO em soluções aquosas e tecidos o que o torna um ótimo parâmetro de medida indireta das concentrações de NO em nosso modelo.

Além do potencial vasodilatador, o óxido nítrico (NO) é reconhecido como um mediador e regulador de respostas inflamatórias. Ele tem propriedades citotóxicas que podem agir contra agentes patogênicos, mas também pode ter efeitos nocivos sobre os tecidos do hospedeiro. A interação do NO com o oxigênio molecular e anion superóxido produz espécies reativas de nitrogênio que podem modificar várias funções celulares. Estes efeitos indiretos do NO desempenham um papel importante na inflamação.

O fato dos níveis de nitrito (metabolito de NO) estarem diminuídos nos implantes tratados com C-ANP₄₋₂₃ implica, pelo menos em parte, esse peptídeo exerce atividade inibitória no tecido fibrovascular modulando o NO, já que PNs e óxido nítrico compartilham a mesma via de sinalização intracelular (ANAND-SRIVASTAVA, 2005; ZICHE and MORBIDELLI, 2009). Esse resultado pode ser compatível com o efeito positivo deste mediador vasoativo na angiogênese (RISTORI, 2008).

Evidências diretas do mecanismo pelo qual o C-ANP₄₋₂₃ atenuou a angiogênese inflamatória no implante de esponja não foram investigadas em nosso estudo. No entanto, no contexto de nossos achados é possível que a interação do C-ANP₄₋₂₃ com o receptor NPR-C resultou na ativação da proteína Gi (inibitória) que por sua vez, inibiu a produção de AMPc, uma importante molécula envolvida na formação de vasos sanguíneos como mostrado em um modelo de hipóxia induzido por retinopatia em camundongo (RISTORI, 2008; ANAND-SRIVASTAVA, 1990). No entanto, nossos resultados e os achados de outros sobre os efeitos dos PNs na regulação da neovascularização divulgam a complexidade da formação de vasos sanguíneos em distintas condições patológicas. O efeito inibitório do C-ANP₄₋₂₃ no componente angiogênico do tecido fibrovascular induzido pela matriz sintética estende a gama de ações dos peptídeos e pode indicar um potencial terapêutico do controle da angiogênese em doenças fibroproliferativas.

7. Conclusões

7. Conclusões

Os resultados deste estudo mostram pela primeira vez a avaliação dos efeitos dos peptídeos natriuréticos (ANP, BNP, CNP e C-ANP₄₋₂₃) na angiogênese inflamatória induzida por uma matriz sintética.

O modelo utilizado permitiu avaliar o componente angiogênico e inflamatório, eventos associados a várias patologias fibroproliferativas e mostrar o efeito seletivo do C-ANP₄₋₂₃ na formação de vasos sanguíneos.

Foi identificado o efeito modulador do C-ANP₄₋₂₃ na modulação do VEGF e o efeito contra-regulatório na produção de NO.

Neste modelo não foi mostrado o efeito dos peptídeos na inflamação avaliados pelos marcadores mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glucosaminidase.

Este estudo amplia a gama de ações do peptídeo C-ANP₄₋₂₃ e pode indicar o seu potencial terapêutico no controle da angiogênese em doenças fibroproliferativas.

8. Abstract

8. Abstract

Natriuretic peptides (NPs), endogenous bioactive peptides, modulate endothelial cell functions, besides their well known effects controlling salt, water and blood pressure homeostasis. To date, the effects of NPs on inflammation and angiogenesis are rather contradictory. In this study we evaluated the effects of these peptides on inflammatory angiogenesis induced by polyether polyurethane sponge implants in mice. The hemoglobin content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue) and blood flow measurements (laser Doppler perfusion imaging) of the implants used as an index of vascularization showed that single dose of C-ANP₄₋₂₃, (a ligand for the natriuretic peptide clearance receptor) but not of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) or C-type natriuretic peptide (CNP) reduced angiogenesis in the implants relative to the PBS-treated group, but failed to modulate inflammation in our system. Histological analysis corroborated the biochemical and functional parameters indicative of inhibition of neovascularization. The decreased vascularization of the implants by the peptide was associated with attenuated production of nitric oxide (nitrite levels) and enhanced levels of VEGF. The inhibitory effect of C-ANP₄₋₂₃ on the angiogenic component of the fibrovascular tissue induced the synthetic matrix extends the range of actions of the peptide and may indicate its therapeutic potential in controlling angiogenesis in fibroproliferative diseases.

Key words: natriuretic peptides, angiogenesis, inflammation, implants, VEGF, nitric oxide

9. Referências

9. Referências Bibliográficas

ANAGNOSTOU, A.; LEE E.S.; KESSIMIAN, N.; *et al.* Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*v. 87, p. 5978-5982,1990.

ANAND-SRIVASTAVA, M.B.; SAIRAM, M.R.; CANTIN, M. Ring-deleted Analogs of Atrial Natriuretic Factor Inhibit Adenylate Cyclase/cAMP System. *J. Biol. Chem.*v. 265, n.15, p. 8566-8572,1990.

ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* .v. 26, p.1044–1059, 2005.

ANDALOUSI, J.E.; LI, Y.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic Peptide Receptor-C Agonist Attenuates the Expression of Cell Cycle Proteins and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Gi Proteins and MAPkinase/ PI3kinase Signaling. *Plos one*, v.8, p.1-11, 2013.

ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in rats sponge model. *Br J Exp Pathol*, v.68, p.755-66, 1987.

[ANDRADE S.P.](#); MACHADO, R.D.; TEIXEIRA, A.S., *et al.* Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. [Microvasc Res](#). v.54(3), p.2532-61, 1997.

ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A. The sponge implant model of angiogenesis. *Methods Mol Biol* 467, 295-304, 2009.

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, p. 53-66.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. *Meth. Immunol.*,v. 162, p.327-334, 1988.

BAUER, D.; GREBE, R.; EHRLACHER, A. A new method to model change in cutaneous blood flow due to mechanical skin irritation part I: comparison between experimental and numerical data. *J Theor Biol.* v.238 (3) ,p. 575-87, 2006.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci*, v.74, p.2827-37, 2004.

BENELLI, R.; LORUSSO, G.; ALBINI, A.; *et al.* Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease *Curr Pharm Des*, v. 12, p.3101-3115, 2006.

[CAMPOS, P.P.](#); ANDRADE, S.P.; MORO, L.; *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. [Histol Histopathol.](#) v.21(12): p.1263-1270, 2006.

CAMPOS, P.P.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. Mechanims of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen.* v. 16, p. 416-424, 2008.

CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; *et al.* Kinetics of implant-induced

inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc Res.* 84, 9-15, 2012.

CASSERLY, B., KLINGER, J.R. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Design, Development and Therapy.*v.3, p. 269–287, 2009.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v. 407, p.249-257, 2000.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, v.473, p. 298-307, 2011.

CHARO, I.F.; TAUBMAN, M.F. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, v. 95, p. 858-866, 2004.

CHIURCHIU, V.; IZZI, V.; D'AQUILIO, F.; *et al.* Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul Pept.* v.148(1–3), p.26–32, 2008.

COHEN, J.R. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas, and vascular malformations. *Am J Med Genet*, v.108, p.265-274, 2002.

CROSS, A.S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; *et al.* Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J. Biolog. Chem.*, v. 278(6), p.4112- 4120, 2003.

DISTLER, J.W.; HIRTH, A.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; *et al.* Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *J Nucl Med* v.47, p.149-161, 2003.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem*, v.98, p.719–33, 1932.

ERSOY, Y.; OZEROL, E.; BAYSAL, O.; *et al.* Serum nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. v. 61, p.76-78, 2002.

FERREIRA, A.B.H. Novo dicionário da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p. 1449, 1975.

FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; *et al.* Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *Br J Pharmacol*, v.141, p.1185-92, 2004.

FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M.M.; *et al.* Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci* . v.81, p. 210-217, 2007.

FISSELER-ECKHOFF, A.; ROTHSTEIN, D.; MÜLLER, K.M. Neovascularization in hyperplastic, mataplastic and potentially preneoplastic lesions of bronchial mucosa. *Vichows Arch*, v. 429, p. 95-100, 1996.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* v. 285, p.1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J.; GREENSPAN, H.P. Influence of geometry on control of cell growth. *Biochem Biophys Acta.*v.417, p.211-231,1975.

FOLKMAN, J. Angiogênese in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nature Med*, v.1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J., WATSON, K., INGBER, D.; et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, v. 339, p. 58-61, 1989.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57:1–18, 2006.

FONTELONGA, A. Angiogênese. 2002. Disponível em: <<http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/angiogenese>> Acesso 26 Abril 2011.

FORD, H.R.; HOFFMAN, R.A.; WING, E.J.; et al. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch. Surg.*v. 124, p. 1422-1428, 1989.

FUGITA, S.; SHIMOJO, N.; TERASAKI, F.; et al. Atrial natriuretic peptide exerts protective action against angiotensin II-induced cardiac remodeling by attenuating inflammation via endothelin-1/endothelin receptor A cascade, *Heart Vessels.* v.28(5), p.646-57, 2013.

GOODWIN, A.M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res.* V. 74, pv 172-83, 2007

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem. Oct.* v.126(1), p.131-138. 1982.

GREENHALGH, D.V. The role of growth factors in wound healing. *J Traum Inj Infec Critical Care.* v.41, p.159-167. 1996.

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Arch Surg.* v.;63(3), p.288-297, 1951.

HERTING. Angiogenesis in the early human chrion and in primary placenta of the macaque monkey. *Contrib. Embriol.* v.146, p. 39-79, 1935.

HIRSCHI, K.K.; D'AMORE, P.A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* v.79, p.419-428,1997.

HORIO, T.; TOKUDOME, T., MAKI, T.; *et al.* Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology*, v.144, p. 2279-84. 2003.

HUNTER, J. *Treatise on the Blood, Inflammation & Gunshot Wounds.* London, 1794.

IZUMI, T.; SAITO, Y.; KISHIMOTO, I.; *et al.* Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- κ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 108(2), 203–213, 2001.

JACKSON, J.R.; SEED, M.P.; KIRCHER, C.H.; *et al.* The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*, v.11,p. 457-465, 1997.

JAIN, R.H. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* v. 9, p.685-693, 2003.

KANGAWA, K.; MATSUO, H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun.*;v.118,p.131-139, 1984.

KIRSTEIN, M.N.; MOORE, M.M.; DUDEK, A.Z. Review of selected patents for cancer therapy targeting tumor angiogenesis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* v.1(2), p.153-61, 2006.

KOMATSU, Y.; NAKAO, K.; SUGA, S. *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology*;129, p.1104-6, 1991.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric Oxide Production and signaling in Inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* v.4(4): p.471-9, 2005.

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, v.87(6),p. 1344-50, 1984.

KROLL, J.; EPTING, D.; KERN, K.; *et al.* Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II

activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis. *Am. j. physiol*, v.296, p.893-899, 2009.

KUHN, M.; VÖLKER, K.; SCHWARZ, K.; *et al.* The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. v.119(7), p.2019-2030, 2009.

LANE, P.; GROSS, S.S. Cell signalling by nitric oxide. *Semin. Nephrol*. v.19, p. 215–219; 1999.

LARA-CASTILLO, N.; ZANDI, S.; NAKAO, S.; *et at.* Atrial natriuretic peptide reduces vascular leakage and choroidal neovascularization. *Am J Pathol*. v.175(6), p.2343-2350, 2009.

LE NOBLE, F.A.C.; HEKKING, J.W.; VAN STRAATEN, H.W.; *et al.* Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Eur J Pharmacol*. v. 195, p. 3005-3006, 1991.

LEVIN, E.R.; GARDNER, D.G.; SAMSON, W.K. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* v.339, p.321-328,1998.

LEY, K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res* v.24, p.87-95, 2001.

LIEKENS, S.; DE CLERCK, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacol*, v.61: 253-270, 2001.

LI, L.M.; KILBOURN, R.G.; ADAMS, J.; FIDLER, I.J. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* v.15;51(10) p.2531-2535, 1991.

LIU, Z. Endoglin is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor induced angiogenesis. *PLOS ONE*, v9, 2014.

MADHANI, M.; SCOTLAND, R.S.; MACALLISTER, R.J.; *et al.* Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling. *Br J Pharmacol.*v.139(7):p.1289–1296, 2003.

MARQUES, S.M; CAMPOS, P.P.; CASTRO, P.R.; *et al.* Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc. Res.* v.82, p.246-252, 2011.

MENDES, J.B.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; *et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc Res* v.78: p.265-271, 2009.

MESSMER-BLUST, A.; AN, X.; LI, J. Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors. *Trends Cardiovasc Med.* 19(8), 252-156, 2009.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* . v.5,p. 62-71, 2001.

MOLET, S.; FURUKAWA, K.; MAGHAZECHI, A.; *et al.* Chemokine- and cytokine-induced

expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol*, v.105, p. 333-338, 2000.

MORO, L.; MARTINS, A. S.; ALVES, C. M.; *et al.* Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.*, v.148, p.153-164, 2003.

MULLANE, K.M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Meth.*, v.74, p.157-167, 1985.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; LEWIS, C.E. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol.* v.15;175(10): p.6257-63, 2005.

NAGAYA, N.; MORI, H.; MUTOKAMI, S.; *et al.* Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol.* v. 288, p. R1432-R1437, 2005.

NALDINI, A.; CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Targets Inflamm Allergy* v.4, p. 3-8, 2005.

NISHIKIMI, T.; KUWAHARA, K.; NAKAO, K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *Am. j. cardiol.* v.57, p.131-140, 2011.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci*, v.99, p. 1501-1506.

OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.R.; MAKAREM, J.A.; *et al.* *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. v.9, p.212- 220, 2007.

PAGANO, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity. *J Biol Chem*. v.276: p.22064–22070, 2001.

PANDEY, K.N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*.v. 26,p.901–932, 2005.

PEACOCK, D.J.; BANQUERIGO, M.L.; BRAHN, E. A novel angiogenesis inhibitor suppresses rat adjuvant arthritis. *Cell Immunol*. v.160, p. 178-184, 1985.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; HU, R.M.; *et al.* Vasoactive peptides modulate vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*. v.272, p.17097-17103, 1997a.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; HU, R.M.; *et al.* Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*. v. 272, p. 17097–1710, 1997b.

PEDRAM, A.; RAZANDI M.; LEVIN, E.R. Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology* v.142, p.1578-1586, 2001.

PLUNKETT, A.; BHAILEY, J.A. An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor

cells entrapped in alginate, *Lab Invest.* V.62, p. 510-517, 1990.

RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone: What a gas! *Br J Rheumatol* 36, 831-838, 1997.

REN, B.; YEE, K.O.; LAWIER, J.; *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 1765:178–188, 2006.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; *et al.* Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* v.100, p.157-163, 2001.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol.*v. 35, p.227–231, 2002.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; ROCCARO, A.M.; *et al.* Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest.* v.33, p. 891-896, 2003.

RIBATTI, D.; CONCONI, M.T.; NUSSDORFER, G.G. Nonclassic Endogenous Novel Regulators of Angiogenesis. *Pharmacol Rev.*v. 59,p. 185-205 ,2007.

RISTORI, C.; FERRETTI, M.E.; PAVAN, B.; *et al.* Adenylyl cyclase/cAMP system involvement in the antiangiogenic effect of somatostatin in the retina: Results from transgenic mice. *Neurochem Res.* v.33(7), p.1247-1255, 2008.

RUEGG, C.; HASMIM, M.; LEJEUNE, F.J.; *et al.* Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta* .v.1765, p.155-177, 2006.

SABBATINI, M.E.; VILLAGRA, A.; DAVIO, C.A.; *et al.* Atrial natriuretic factor stimulates exocrine pancreatic secretion in the rat through NPR-c receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v.285, p.929–937, 2003.

SHIGERI, Y.; FUJIMOTO, M. Neuropeptide Y stimulates DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Neurosci Lett*, v.149, p. 19-21, 1993.

SHMILOVICH, H.; BEN-SHOSHAN, J.; TAL, R.; *et al.* B-type natriuretic peptide enhances vasculogenesis by promoting number and functional properties of early endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A.* v.15(9), p.2741-2749, 2009.

SORENSEN, O.; BORREGAARD, N. Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. *J. Immunol. Meth.*,v. 232, p.179-190, 1999.

SPRENG, D.; SIGRIST, N.; SCHWEIGHAUSER, A.; *et al.* Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: Detection in urine, serum and synovial fluid specimens. *Vet Surg.* v.30, p.191-199, 2001.

STICHTENOTH, D.O.; FRÖLICH, J.C. Nitric oxide and inflammatory joint disease. *Br J Rheumatol.* v.37, p.146-257, 1998.

SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*;332: p.78-81. 1988.

SUGA, S.; NAKAO, K.; ITOH, H.; *et al.* Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of

“vascular natriuretic peptide system”. *J Clin Invest*;90, p.1145-9. 1992

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; *et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.*, v.132(2),p. 345-352,1983.

XI, W.W.; CHENG G.; LV S.; *et al.* An elevated level of BNP in plasma is related to the development of good collateral circulation in coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 18(6), 797–802, 2011.

YAMAHARA, K.; ITOH, H. Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature. *The Adv Cardiovasc Dis.* v.3(1), p.17-27, 2009.

ZHANG, K.; LU J.; MORI T.; *et al.* Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activation the $ERR\alpha/PGC-1\alpha$ pathway. *Cardiovasc. res*, v.89, p.426-435, 2011.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw.* v.20(4), p.164-170, 2009.