

MÔNICA ALVES NEVES DINIZ FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE,
INFLAMAÇÃO E CRESCIMENTO TUMORAL
EM CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO
GÊNICA DOS RECEPTORES PARA O PAF
(PAFR-KO).**

Belo Horizonte

2006

MÔNICA ALVES NEVES DINIZ FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE, INFLAMAÇÃO E
CRESCIMENTO TUMORAL EM CAMUNDONGOS COM
DELEÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES PARA O PAF
(PAFR-KO).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Fisiologia

**Orientadora: Prof^a. Dra. SILVIA PASSOS ANDRADE
UFMG**

Laboratório de Angiogênese
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
Belo Horizonte
2006

A DEUS, pela força e luz que me permitiram chegar até aqui,

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos fontes constantes de amor, apóio,
alegria e dedicação,

Ao Nelder, companheiro e amigo em todas as horas,

Aos amigos, pelo apoio e convivência.

AGRADECIMENTOS

- Profa. Silvia Passos Andrade
- Prof. Mauro M. Teixeira
- Y. S. Bakhle (Mick)
- Lucíola da Silva Barcelos
- Prof. Anílton C. Vasconcelos
- Paula P. Campos
- Fernanda Araújo
- Funcionários do CEBIO / ICB
- Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG, PRONEX.

RESUMO

O lipídio endógeno, fator ativador plaquetário (PAF), é comumente considerado um mediador pró-inflamatório e pró-angiogênico com base na aplicação exógena deste composto e antagonistas de seus receptores in vitro e in vivo.

Neste trabalho, usando camundongos com inativação do gene (nocaute (KO)) para o receptor do PAF (PAFR-KO) foram avaliadas várias atividades deste mediador em dois modelos de angiogênese (modelo de implante de esponjas; angiogênese inflamatória e os tumores sólidos de Ehrlich e cólon; angiogênese tumoral). Nestes modelos foram caracterizadas a neovascularização, a inflamação e a produção de citocinas. Além disso, o crescimento dos tumores sólidos nestes animais foi determinado. A angiogênese, avaliada por análise morfométrica nos implantes e pela dosagem do conteúdo de hemoglobina, nos dois tecidos estava aumentada tanto nos implantes como no tumor de cólon dos animais nocaute. Níveis aumentados do VEGF foram predominantes nos tumores dos animais nocaute (compatível com o aumento da angiogênese) e os do TNF-alfa variaram entre os tecidos avaliados nos dois grupos de animais.

O acúmulo de neutrófilos e macrófagos determinados pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) respectivamente, nos implantes e tecidos tumorais foram significativamente menores nos animais PAFR-KO, confirmando os efeitos pró-inflamatórios do PAF. Os níveis da quimiocina KC foram maiores no implante dos animais nocaute. Nos tumores, esta quimiocina foi menor apenas no tumor de Ehrlich nestes animais. Não houve diferença entre os pesos dos tumores de cólon nos dois grupos de animais. No entanto, o crescimento do adenocarcinoma de Ehrlich no período de 25 dias foi seis vezes maior nos animais KO comparados aos selvagens. Os resultados deste estudo mostram que a inflamação e a angiogênese em camundongos PAFR-KO não são eventos causais e "propomos" que o PAF endógeno "pode ser" um importante mediador inibitório da neo-formação vascular e do desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.

ABSTRACT

The endogenous lipid, platelet activating factor (PAF), is usually considered a pro-angiogenic mediator due to its exogenous in vitro and in vivo effects and to studies with PAF receptor (PAFR) antagonists in vivo. In this study, mice with gene inactivation of the receptor for PAF (PAFR-KO) we'll used to analyze a range of activities exhibited by this mediator. Two experimental designs were used: the sponge implantation and the growth of solid tumors (Ehrlich and colon) to assess neovascularization, inflammation, cytokine production. Angiogenesis as determined by morphometric analysis and hemoglobin content was significantly higher in the implants and colon tumor of knock out (KO) mice compared with the wild type (WT). VEGF content in the tumors was also, higher in these animals. The levels of TNF-alpha were increased in Ehrlich tumor in KO mice relative to the WT group. Neutrophils and macrophages accumulation, as determined by myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) were decreased in all proliferating tissues in KO animals, supporting the pro-inflammatory effects of endogenous PAF. The levels of the pro-inflammatory chemokines did not follow the same pattern. The growth of colon tumor was not different between the KO and WT mice. However, Ehrlich tumor was six fold bigger in PAFR-KO mice than in WT animals. We have shown that inflammation and angiogenesis in PAFR-KO mice are not necessarily causal events and propose that PAF may be an important endogenous inhibitor of new blood vessels formation and Ehrlich tumor development.

ILUSTRAÇÕES e TABELA

	Página
FIG. 1 FORMAÇÃO VASCULAR.....	13
FIG. 2 ETAPAS DA ANGIOGÊNESE.....	24
FIG. 3 ESTRUTURA MOLECULAR DO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS (PAF).....	26
FIG. 4 REATIVIDADE VASCULAR AO PAF.....	56
FIG. 5 MODELO EXPERIMENTAL DE IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE ESPONJA.....	58
FIG. 6 ESQUEMA DA REPRODUÇÃO DOS TUMORES DO COLON E DE EHRLICH SÓLIDO.....	60
FIG. 7 ESQUEMA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA NO IMPLANTE DE ESPONJA.....	63
FIG. 8 CURVA PADRÃO DE HEMOGLOBINA (Hb).....	64
FIG. 9 ESQUEMA DA DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	68
FIG. 10 ESQUEMA DA DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA <i>N</i> -ACETIL- β - <i>D</i> -GLICOSAMINIDASE (NAG).....	70
FIG. 11 ESQUEMA DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DOSAGEM DE VEGF, TNF- α , CXCL2(KC) e CCL2(MCP-1/JE).....	72
FIG. 12 CURVAS PADRÕES DAS CITOCINAS VEGF E TNF- α	73
FIG. 13 CURVAS PADRÃO DE CCL2(MCP-1/JE) E CXCL2(KC).....	74
FIG. 14 RESPOSTA VASOCONSTRITORA PARA O PAF NA PELE DE CAMUNDONGOS PAFR-KO.....	78
FIG. 15 PERFIL DA ANGIOGÊNESE NOS IMPLANTE DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	79
FIG. 16 CORTES HISTOLÓGICOS DE IMPLANTES DE ESPONJAS DE CAMUNDONGO WT E PAFR-KO (7 E 14 DIAS) CORADOS COM GIEMSA.....	81
FIG. 17 EFEITO DO ANTAGONISTA DO PAF, UK 74505, NA ANGIOGÊNESE DOS IMPLANTES DE ESPONJA COM 7 DIAS.....	83

FIG. 18	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRO-ANGIOGÊNICAS E SUA PRODUÇÃO NOS IMPLANTES DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	84
FIG. 19	INFLUXO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS NO IMPLANTE DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	86
FIG. 20	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	88
FIG. 21	AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NOS TUMORES SÓLIDOS DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	89
FIG. 22	AVALIAÇÃO DE VEGF E TNF- α NOS TUMORES DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	91
FIG. 23	AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (NEUTRÓLIFOS) E DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS NOS TUMORES DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	92
FIG. 24	AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS E DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINA NOS TUMORES DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.....	94
TABELA 1	QUANTIFICAÇÃO DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	82

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang	Angiopoetina
B16	Linhagem de melanoma
CCL2(MCP-1/JE) ..	Proteína quimiotática de monócitos 1
COX	Ciclooxigenase
CSFs	Fator estimulador de colônias
CT26	Linhagem de tumor de cólon
CXCL2(KC)	Quimiocina derivada de queratinócito
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's essential medium</i>
EDTA	<i>Ethilene diamine tetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzime-linked immunosorbent assay</i>
EPCs	Células endoteliais precursoras
EPO	Peroxidase de eosinófilo
F10	Linhagem de melanoma
FCS	Soro fetal bovino
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
Hb	Hemoglobina
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
MAPKs	Proteína ativada por mitógenos
MCP-1(JE)	Proteína quimiotática de monócitos 1
MEC	Matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NK	<i>Natural Killer</i>

NF-κB	Fator de transcrição nuclear κ B
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAFR	Receptor do PAF
PAFRKO	Nocautado para receptor do PAF
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PD-ECGF	Fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PMN	Leuccito polimorfonuclear
T$^{1/2}$	Meia vida
TDCF	Fator quimiotático derivado de tumor
TGF-β	Fator de crescimento transformante β
TNFR	Receptor de TNF
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UK-74505	1,4-dihidropiridina
VCAM	Molécula de adesão da célula vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT	<i>Wild-type</i> (animal selvagem)

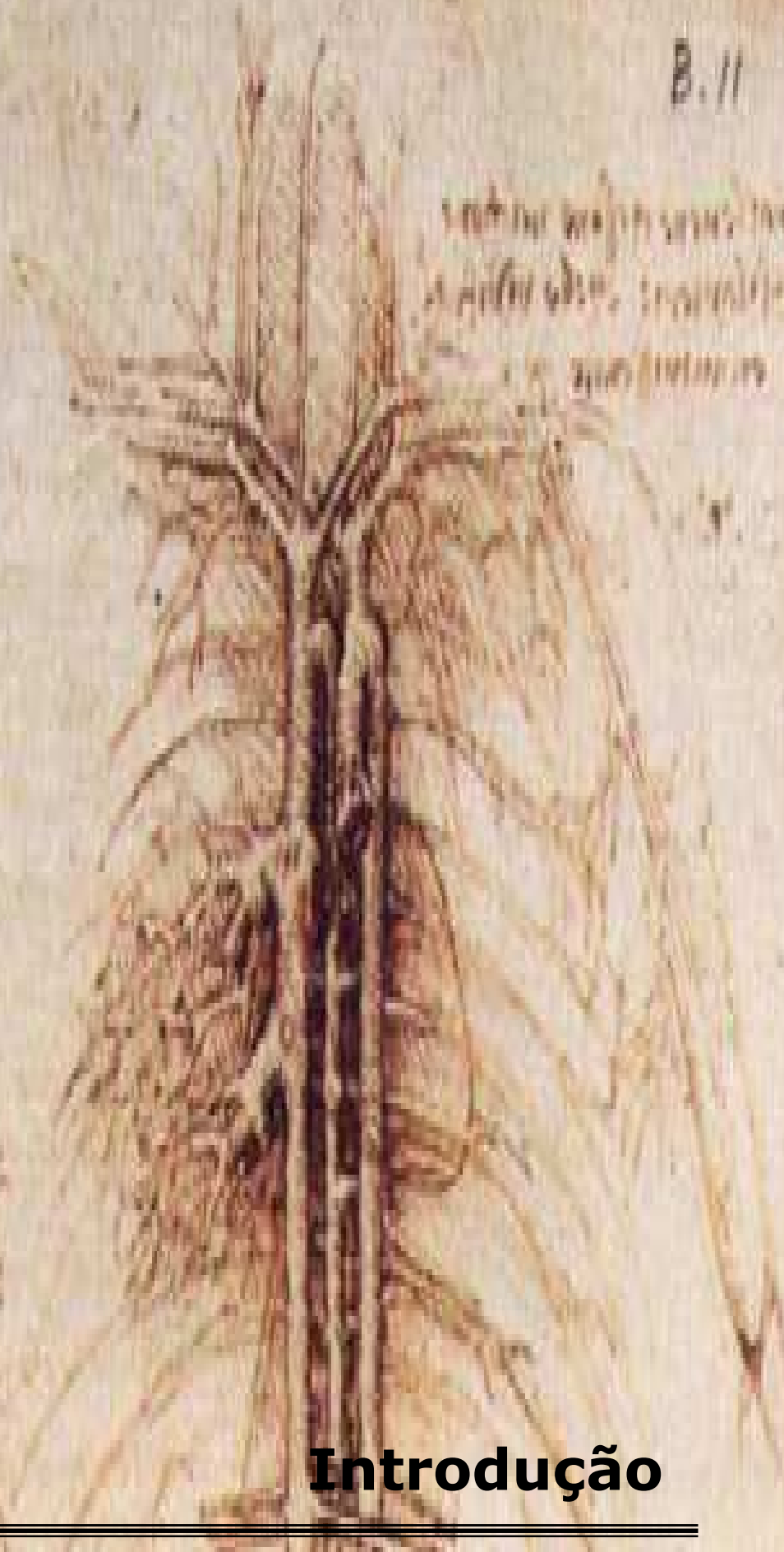
SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Fator ativador de plaquetas (PAF).....	12
1.2. Angiogênese.....	21
1.3. Inflamação.....	27
1.4. Citocinas e quimiocinas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias.....	29
1.5. Neoplasia.....	35
1.6. Neoplasias experimentais.....	41
1.6.1. <i>Tumor de Ehrlich</i>	42
1.6.2. <i>Tumor de cólon</i>	43
1.7. Angiogênese na inflamação e no desenvolvimento tumoral.....	44
1.8. Animais nocaute.....	47
2. JUSTIFICATIVA.....	49
3. OBJETIVOS.....	52
3.1. Objetivo geral.....	52
3.2. Objetivos específicos.....	52
4. METODOLOGIA.....	54
4.1. Modelos animais.....	54
4.2. Reatividade farmacológica da rede vascular cutânea ao PAF em camundongos PAFR-KO e WT.....	54
4.3. Preparação e implantação de discos de esponja.....	56
4.4. Avaliação do efeito do UK 74505 na angiogênese induzida pelo implante.....	59
4.5. Manutenção das células tumorais.....	59
4.6. Contagem e viabilidade das células tumorais.....	60
4.7. Reprodução de tumores nos animais.....	61
4.8. Quantificação da angiogênese através da dosagem de hemoglobina.....	62
4.9. Técnicas histológicas.....	64
4.10. Análise morfométrica da vascularização no implante de esponja.....	65
4.11. Técnica para dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	66
4.12. Técnica para dosagem da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).....	69
4.13. Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF, TNF- α , CXCL2(KC) e CCL2(MCP-1/JE).....	70
4.14. Análise estatística.....	75
5. RESULTADOS.....	77
5.1. Reatividade vascular.....	77
5.1.1. <i>Resposta da rede vascular cutânea ao PAF em camundongos PAFR-KO e</i>	

<i>WT</i>	77
5.2. Avaliação dos implantes de esponja.....	77
5.2.1. Avaliação da angiogênese induzida pelo implante em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	77
5.2.2. Avaliação histológica da angiogênese.....	80
5.2.3. Avaliação do efeito do UK 74505, na angiogênese induzida pelo implante de esponja.....	82
5.2.4. Avaliação do VEGF e TNF- α - citocinas envolvidas na angiogênese.....	82
5.2.5. Cinética da inflamação e de quimiocinas induzidas pelo implante de esponja em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	85
5.3. Avaliação do crescimento vascular, da inflamação e produção de citocinas nos tumores de cólon e Ehrlich.....	87
5.3.1. Crescimento tumoral em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	87
5.3.2. Avaliação da angiogênese nos tumores em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	87
5.3.3. Avaliação de citocinas pro-angiogênicas nos tumores em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	90
5.3.4. Avaliação da inflamação e de quimiocinas induzidas pelo crescimento tumoral em camundongos <i>WT</i> e <i>PAFR-KO</i>	90
6. SINÓPSE DOS RESULTADOS.....	95
7. DISCUSSÃO.....	97
8. CONCLUSÕES.....	107
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
10. ANEXO 1 – PUBLICAÇÃO	152
11. ANEXO 2 – EDITORIAL SOBRE A PUBLICAÇÃO.....	161

Handwritten text in a script, possibly Indic, located in the upper left corner of the page.

Handwritten text in a script, possibly Indic, located in the upper right corner of the page.



Introdução

Handwritten text in a script, possibly Indic, located at the bottom left corner of the page.

Handwritten text in a script, possibly Indic, located at the bottom right corner of the page.

1. Introdução

1.1 Fator Ativador de Plaquetas (PAF)

Um grande número de fosfolípidos estruturalmente relacionados, alguns dos quais gerados de maneira não regulada, pertencem à família dos fatores ativadores de plaquetas ou PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina). O termo "PAF" na grande maioria dos trabalhos se refere a 1-alkil ou 1-acil glicerofosfocholinas que contém grupos acil sn-2 pequenos e/ou oxidados e que são reconhecidos pelo receptor PAF presente na superfície de uma grande variedade de células.

Embora, o fator ativador de plaquetas seja geralmente considerado como uma única molécula com diversos e potentes efeitos biológicos, há uma variedade de moléculas fosfolípídicas, estruturalmente relacionadas, que compartilham muitas das mesmas atividades fisiológicas. A estrutura química destas moléculas influencia na potência biológica do PAF. A análise espectral de massa realizada no PAF sintetizado de polimorfonucleares (PMN) humano mostrou, a presença de diferentes espécies moleculares de alkil-PAF e a produção de acil-PAF. Investigações feitas sobre a potência de alkil-PAF e acil-PAF *in vitro*, usando plaquetas de coelho, PMN humanos e coração isolado de cobaia e *in vivo* sugerem que, as diferenças nas propriedades biológicas destas espécies moleculares de PAF podem estar relacionadas a variações nas propriedades biofísicas como, concentração micelar crítica¹, afinidade de ligação com albumina, ou na existência de mais de um subtipo de receptor para o PAF (Montrucchio et al., 2000).

¹ A concentração onde inicia o processo de formação de micelas (agregados de moléculas formados em solução aquosa).

A estrutura molecular do PAF foi descoberta através de investigações paralelas sobre duas diferentes atividades biológicas: a primeira estava presente no sangue de coelhos com choque anafilático e era capaz de ativar plaquetas. A segunda era provocada por um lipídio presente no rim que era capaz de abaixar a pressão sangüínea. Um novo campo de pesquisa emergiu quando a estrutura dos compostos responsáveis por ambas às respostas foi mostrado ser o 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (PAF) FIG. 1 (Prescott et al., 1990; Venable et al., 1993).

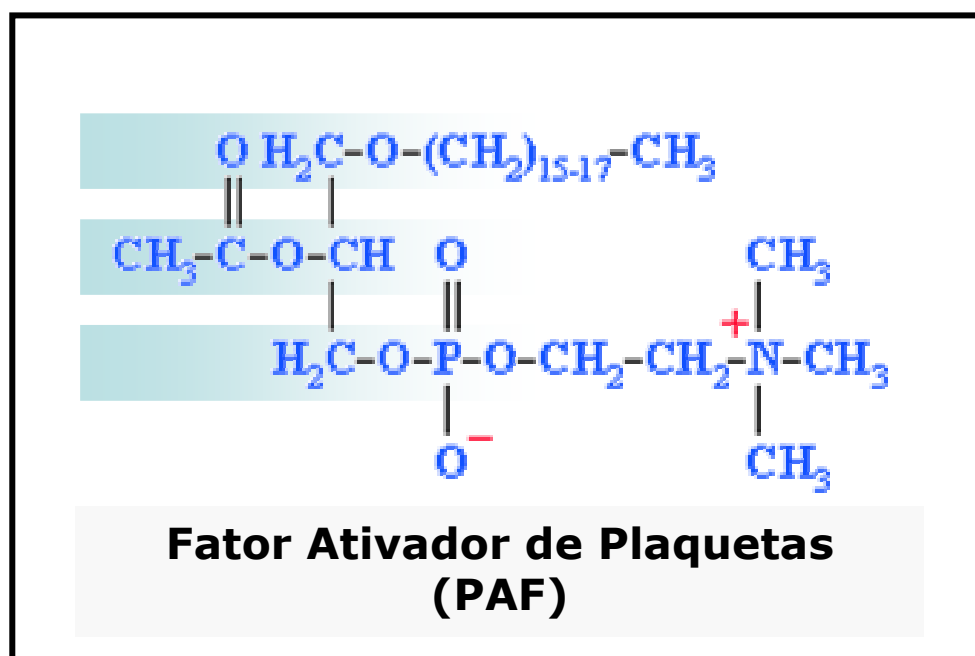


FIGURA 1 – ESTRUTURA MOLECULAR DO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS (PAF).

O PAF foi o primeiro mediador lipídeo, derivado de fosfolipídios, a funcionar como um mediador intercelular e também como mensageiro intracelular. Esta sinalização resulta da ligação do PAF a receptores específicos e não de efeitos físico-químicos sobre a membrana plasmática de células alvo. Para que o PAF seja biologicamente ativo é necessário que sua molécula apresente

características estruturais bem específicas de modo que possa se ligar a moléculas de receptores e enzimas envolvidas no processo de degradação e/ou de síntese. Seu reconhecimento como substrato é importante pois, se a degradação enzimática não fosse específica para esta estrutura não usual de fosfolípido, haveria uma hidrólise contínua de fosfolípidos estruturais (Venable et al., 1993; Prescott et al., 2000).

Uma variedade de células que participam do processo inflamatório como os monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas produzem PAF (Camussi et al., 1990; Triggiani et al., 1991). As células endoteliais humanas produzem PAF quando estimuladas por vários mediadores inflamatórios tais como trombina, angiotensina II, vasopressina, leucotrienos C4 e D4, histamina, bradicinina, elastase, catepsina G, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), plasmina, interleucinas (IL)-8 e IL-1 α , e fator de necrose tumoral (TNF)- α (Camussi et al., 1983; Montrucchio et al., 1996). Cardiomiócitos lesados também sintetizam PAF (Janero & Burghardt 1990).

Muitos tipos celulares que sintetizam PAF, incluindo células endoteliais, expressam receptores para este mediador em sua superfície e são alvos para a sua ação (Bussolino et al., 1996).

O PAF é biologicamente sintetizado principalmente por duas vias. Uma é a "via de remodelagem", utilizada por células inflamatórias estimuladas. A outra, a "via de novo" ocorre principalmente no rim e no sistema nervoso central (Montruchio et al., 2000).

A síntese do PAF é altamente regulada e freqüentemente envolve um mecanismo de dois passos. O primeiro é a hidrólise de um ácido graxo de cadeia longa esterificado na posição sn-2 do "arcabouço" de glicerol do 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina e é catalisada pela fosfolipase A₂ citosólica; subseqüentemente o

produto desta hidrólise (liso-PAF) é acetilado por uma acetil transferase para produzir PAF bio-ativo (Snyder et al., 1985). Os efeitos biológicos do PAF são mediados pela ligação a proteína G acoplada ao receptor que reconhece especificamente o PAF e lipídeos "PAF-like" (Honda et al., 1991; McIntyre et al., 1999). O receptor murino do PAF tem sido deletado por recombinação homóloga e também super expressados, produzindo importante compreensão sobre o papel biológico e fisiopatológico do sistema de sinalização do PAF (Ishii et al., 1998).

Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) são parte da família de receptores compostos de sete domínios transmembrana. Estes receptores são tradicionalmente expressos na membrana citoplasmática das células. Entretanto, existem evidências crescentes de que alguns peptídeos possuem seus receptores GPCRs, localizados no núcleo e na região perinuclear (Bkaily et al., 2000; Gobeil et al 2003). O receptor do PAF faz parte da família GPCRs e, existem evidências farmacológicas que dão suporte para a presença de sítios de ligação intracelular do PAF (Bazan, 1998; Liu et al., 2001). Marrache et al., 2002 usando técnicas variadas e modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*, demonstraram a geração de PAF e a presença de receptores PAF funcionais no núcleo. Também foi demonstrado por esses pesquisadores que, a estimulação destes receptores nucleares induzem a expressão dos genes da ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico síntase induzida (iNOS); e que esta indução é dependente de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK quinase) e fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). Nesse trabalho, também fica evidente que os segundos mensageiros ligados aos receptores PAF de membrana e nuclear do mesmo tipo celular são diferentes. Tem sido postulado que os receptores de superfície e os intracelulares teriam funções distintas. Os efeitos parácrinos (efeitos imediatos) seriam mediados pelos receptores da

membrana celular, enquanto os efeitos intracrininos (regulação de transcrição gênica) poderiam ser dependentes dos receptores nucleares. A noção de receptores nucleares funcionais é reforçada pela presença de sinalização efetora no núcleo. Esta sinalização envolve proteínas G, canais iônicos, fosfolipases A₂, C e D, adenilatociclase, óxido nítrico sintase, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e NF-κB (Gobeil et al., 2003).

Vários mecanismos regulam o sistema de sinalização envolvido com o PAF. Estes mecanismos incluem uma síntese rigorosamente controlada, uma regulação espacial da liberação do PAF, expressão celular específica de receptores de PAF e uma rápida degradação do PAF por acetilhidrolases extra e intracelular. PAF-acetilhidrolases (PAF-AH) são enzimas responsáveis pela degradação do PAF e de fosfolípidios oxidados (compostos PAF-like) com pequenos resíduos na posição sn-2. As avaliações bioquímicas realizadas em mamíferos revelaram a existência, de pelo menos três tipos de enzimas PAF-acetilhidrolases, as PAF-AH intracelular tipo I e II e a PAF-AH plasmática (Hattori et al, 1995,). Evidências experimentais e clínicas têm mostrado que, o sistema de sinalização do PAF está envolvido na transferência de informações nos processos inflamatórios e trombóticos. Por essa via de sinalização, do receptor do PAF, é induzida uma resposta homeostática celular entretanto, essa sinalização também pode mediar eventos patológicos se estiver desregulada e, esse é um mecanismo de doença. A PAF-AH plasmática é um fator chave envolvida nessa regulação e seus níveis são modulados na inflamação, nas lesões pela sepse e em outras condições patológicas (Tjoelker et al., 1995; Prescott et al., 2000; Faria-Neto et al., 2005).

O desenvolvimento de antagonistas do PAF tem contribuído para a identificação de receptores específicos do PAF e também para a aplicação clínica das pesquisas sobre o PAF. Existem três classes

estruturais de antagonistas do PAF. A primeira de produtos naturais, como o BN 52021, um terpenoide derivado de *Ginkgo biloba*, um antagonista competitivo do PAF. Na segunda classe encontram-se substâncias com estruturas sintéticas análogas ao PAF como o CV 3988, CV 6209, TCV 309, E 5880. A terceira classe compreende os outros compostos sintéticos cuja estrutura química não é análoga ao PAF tais como o WEB 2086 (Apafant), UK 74505 (1,4-dihidropiridina), Modipafant (UK 80067, (+)- enantiômero do UK 74505), BB 882 (Lexipafant) (Terashita et al., 1983; Casals-Stenzel et al., 1987; Braquet et al., 1991; Ishii & Shimizu 2000).

O UK 74505 tem sido administrado por via oral ou intravenosa e demonstrou ser extremamente ativo em animais de várias espécies. Doses i.v. de 30 e 100µg/kg de UK inibiu a resposta broncoconstritora do PAF em cobaias sem afetar a pressão arterial ou o débito cardíaco (Alabaster et al., 1991). O aumento da permeabilidade vascular cutânea em ratos pela administração intradérmica de PAF também foi inibida pelo UK 74505 (Alabaster et al., 1991). Parry et al., 1994 utilizando UK 74505 em plaquetas de coelho inibiram a agregação dessas células, induzida pelo PAF. Este antagonista foi 10-30 vezes mais potente que o WEB 2086 na inibição dos efeitos, hipotensor em ratos, na permeabilidade vascular cutânea em cobaias e na letalidade em camundongos, induzidos pelo PAF (Alabaster et al., 1991; Parry et al., 1994). Estes efeitos demonstraram ser o UK 74505 um potente e seletivo antagonista do PAF *in vitro* e *in vivo* (Alabaster et al., 1991; Parry et al., 1994). UK 74505 (0,5mg/kg), administrado i.v. inibiu a formação de edema e a agregação plaquetária induzida pelo PAF exógeno (Pons et al., 1993; Miotla et al., 1998).

O PAF induz nos PMNs polarização da célula, aumento de motilidade, desgranulação e redistribuição de ligantes de superfície, respostas importantes na inflamação. A adesão de PMNs é mediada

por alterações dependentes de ativação que modificam a afinidade e a avidéz das integrinas β_2 em sua superfície. (Prescott et al., 2000).

In vitro, o aumento na permeabilidade da monocamada endotelial, a contração de músculo liso e do miométrio e os efeitos arritmogênico inotrópico² negativo³ sobre o músculo cardíaco são efeitos atribuídos ao PAF (Montrucchio et al., 2000).

Na inflamação, o PAF tem ações bem caracterizadas, mediando interações célula-célula em modelos de inflamação aguda e crônica em praticamente todos os órgãos. Estudos mostram que o PAF pode mediar sinalização parácrina atuando em pequenas distâncias. Em alguns casos, o PAF também pode atuar de maneira autócrina, intácrina e endócrina (Bazan et al., 1991; Prescott et al., 2000). Este último modo de ação é controlado por uma PAF-acetilhidrolase do plasma, a qual limita a meia-vida do PAF em poucos minutos no sangue humano e de animais experimentais. Experimentos usando modelos de inflamação aguda têm também demonstrado, que a sinalização pelo PAF pode ocorrer entre células intimamente justapostas - sinalização justácrina⁴. Estes modelos também demonstraram que o PAF atua cooperativamente com proteína de adesão, a P-selectina, na superfície da célula endotelial, e que a resposta de ativação desencadeada pelos sinais enviados, via receptor do PAF, a célula alvo modifica mais a interação intercelular (Prescott et al., 2000).

O PAF é um potente fosfolípido pro-inflamatório com diversos efeitos fisiológicos e patológicos. Em alguns sistemas suas ações são realizadas em concentrações tão baixas quanto 10^{-12} M e quase sempre a 10^{-9} M quando age como um mensageiro intercelular (Prescott et al., 1990; Montrucchio et al., 2000).

² Que influencia a contratilidade do tecido muscular.

³ Enfraquecimento da ação muscular.

⁴ Justácrina: é um tipo especial de sinalização parácrina. Ocorre quando a molécula sinalizadora estiver estabilizada na membrana da célula e ligar-se a um receptor na membrana plasmática de outra célula.

Os estudos envolvendo o PAF têm mostrado que os efeitos fisiológicos desses mediadores devem-se somente a um membro desta família de moléculas, o análogo contendo um grupo *sn*-acetil. Esse fosfolípido biologicamente ativo é mediador de processos tão diversos quanto cicatrização de feridas, inflamação, apoptose, angiogênese, reprodução e potencialização⁵ de longa duração. (Ben Ezra, 1978; Form & Auerbach, 1983; Kanayasu et al., 1989; Andrade et al., 1992b; Tsopanoglou et al., 1994; Bussolino et al., 1995; Camussi et al., 1995; Jackson et al., 1998; Stafforini et al., 2003).

O PAF *in vivo*, usando matrigel, mostrou uma resposta angiogênica dose-dependente, a qual em concentrações farmacológicas (1-5 µM) não requer heparina mas, em concentrações fisiológicas (5-50 nM) o efeito foi dependente desta substância (Camussi et al., 1995).

Perguntas do tipo, como pode um mediador estar envolvido em tantas vias diferentes? e como um mediador pode originar uma grande diversidade de ações? são respondidas por Stafforini et al., 2003, mostrando que pelo menos três observações corroboram estes fatos. Primeiro, uma variedade de estímulos trombóticos e inflamatórios ativam vias envolvidas na síntese regulada do PAF, fazendo assim do PAF um mediador "unificador" para múltiplas moléculas sinalizadoras. Segundo, o receptor específico com o qual os membros desta família interagem é expresso na superfície de uma grande variedade de tipos celulares, tornando possível ao PAF atuar em diversos tecidos e órgãos. Terceiro, a ocupação do receptor do PAF gera sinais específicos que são transduzidos usando diferentes moléculas efetoras em cada tipo celular.

Vários trabalhos têm demonstrado que quando as células endoteliais são estimuladas com VEGF, fator de necrose tumoral

⁵Interação entre dois ou mais fármacos ou agentes que resulta em uma resposta farmacológica maior que a soma das respostas individuais de cada fármaco ou agente.

(TNF)- α e com o Fator de crescimento de hepatócitos (HGF) elas produzem PAF. Tais observações podem ser de particular relevância no estudo do crescimento e, angiogênese tumoral pois, o PAF tem sido detectado em lesões neoplásicas tais como sarcoma de Kaposi (KS) e carcinomas de mama. Muitas linhagens de células tumorais em cultura produzem PAF ou respondem a sua estimulação e camundongos transgênicos que super expressam o PAFR desenvolvem tumores melanocíticos (Camussi et al., 1997; Ishii et al., 1997; Montrucchio et al., 1998). As observações de que o aumento na colonização do pulmão por células de melanoma (B16-F10) inoculadas em animais tratados com interleucina (IL)-1 e TNF- α podem ser prevenido pelo antagonista do PAF BN 50739, sugere o envolvimento deste mediador no processo de metástase (Im S-Y et al., 1996). A utilização de WEB 2086 em experimentos com melanoma e carcinoma de cólon demonstrou ser este antagonista capaz de inibir a adesão dessas células ao endotélio vascular corroborando a idéia do favorecimento dessa adesão ser devido ao PAF (Im S-Y et al., 1996; Mannori et al., 1997). Assim, esses dados sugerem um papel para o PAF na biologia dos tumores.

Na literatura há evidências demonstrando os efeitos do PAF exógeno como um indutor efetivo da angiogênese *in vivo* (Andrade et al, 1992b; Jackson et al., 1998) e, como um indutor do desenvolvimento tumoral (Bussolino et al., 1995; Kume & Shimizu, 1997). Os fibroblastos imortalizados derivados do rim de ratos normais (células NRK), superexpressam receptores PAF. O fator de crescimento epidermal (EGF) é fortemente inibido pelo PAF exógeno induzindo o crescimento mitótico (Kume & Shimizu, 1997). Sabe-se ainda, que células de carcinoma humano de cólon expressam PAFR, a proliferação das células malignas é inibida, sua diferenciação é induzida e ocorre ativação concomitante de proteínas cinases ativadas por mitógenos (ERK, Mek e quinases N-terminal Jun) nestas

células, em resposta ao tratamento com PAF. Estes dados apontam o PAF com um modulador da proliferação e diferenciação das células do carcinoma de cólon humano (Wang & Chakrabarty, 2003). Embora haja todas estas evidências sobre o efeito do PAF exógeno, os efeitos do PAF endógeno na angiogênese e no desenvolvimento tumoral são menos convincentes.

A manipulação genética de camundongos representa uma poderosa ferramenta experimental para o estudo da importância funcional de componentes gênicos específicos em sistemas fisiológicos complexos, além de possibilitar o estudo das consequências dessas alterações gênicas em várias condições patológicas. Vários modelos de camundongos, com alterações genéticas no sistema vascular têm contribuído para elucidar processos biológicos complexos e, doenças cujo componente angiogênico é predominante, tais como aterosclerose (Carmeliet et al., 1998; Faraci & Sigmund, 1999).

Estudos em camundongos transgênicos com super expressão de receptores de PAF (PAFR) mostraram que estes animais desenvolvem tumores de pele após envelhecimento. Estes achados fornecem um novo *insight* sobre o papel do PAF na morfogênese da derme bem como sobre a atividade mitogênica do PAF e PAFR *in vivo* (Ishii et al., 1997).

1.2 Angiogênese

O desenvolvimento e o funcionamento adequado dos tecidos dependem de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune. Esse suprimento é fornecido através dos vasos sanguíneos. No embrião o plexo vascular primitivo se origina do mesoderma por vasculogênese. Uma diferenciação *in situ* de

células precursoras indiferenciadas, os angioblastos, para células endoteliais que se reúnem formando uma rede vascular primitiva (FIG. 2) (Risau, 1997; Jain, 2003).

Os angioblastos se diferenciam em células endoteliais que formam artérias, veias, linfáticos e podem gerar pericitos e células musculares lisas da parede vascular (Yamashita et al., 2000).

O plexo vascular primitivo consiste numa teia de tubos e sacos de células endoteliais, os quais posteriormente sofrem remodelamento transformando-se em uma rede vascular madura. O remodelamento envolve a formação de pequenos e grandes vasos, o estabelecimento de um fluxo direcional, as associações com células murais, também denominadas células periendothelias (pericitos e músculo liso) e o ajuste da densidade vascular para satisfazer as exigências nutricionais do tecido. Na fase inicial o plexo vascular é exuberante e o ajuste final da densidade vascular envolve a regressão dos vasos desnecessários (Benjamin et al., 1998).

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (Folkman & Brem, 1992).

Atualmente o termo angiogênese tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares preexistentes e para demonstrar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa. A angiogênese envolve distintas formas de crescimento vascular. Elas têm início com a dilatação de vênulas preexistentes, as quais podem sofrer brotamento, ou tornarem-se divididas por colunas de células periendothelias, processo denominado

intussuscepção ou, por pontes de células transendoteliais, as quais dividem o vaso em capilares distintos (FIG. 2) (Benjamin et al., 1998; Carmeliet, 2000).

No indivíduo adulto, novos vasos surgem principalmente por angiogênese, embora a vasculogênese também possa ocorrer. Essa neovascularização também acontece pelo recrutamento de células semelhantes aos angioblastos, denominadas células progenitoras endoteliais (EPCs), da medula óssea (Conway et al., 2001)

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos assim, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido. Essa heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos (p.ex. VEGF, Angiopoetina (Ang)-1) que variam grandemente em diferentes tecidos e, por fatores angiogênicos órgão-específicos que determinam a alteração angiogênica, mas de modo específico para os diferentes órgãos (Benjamin et al., 1998; Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2003).

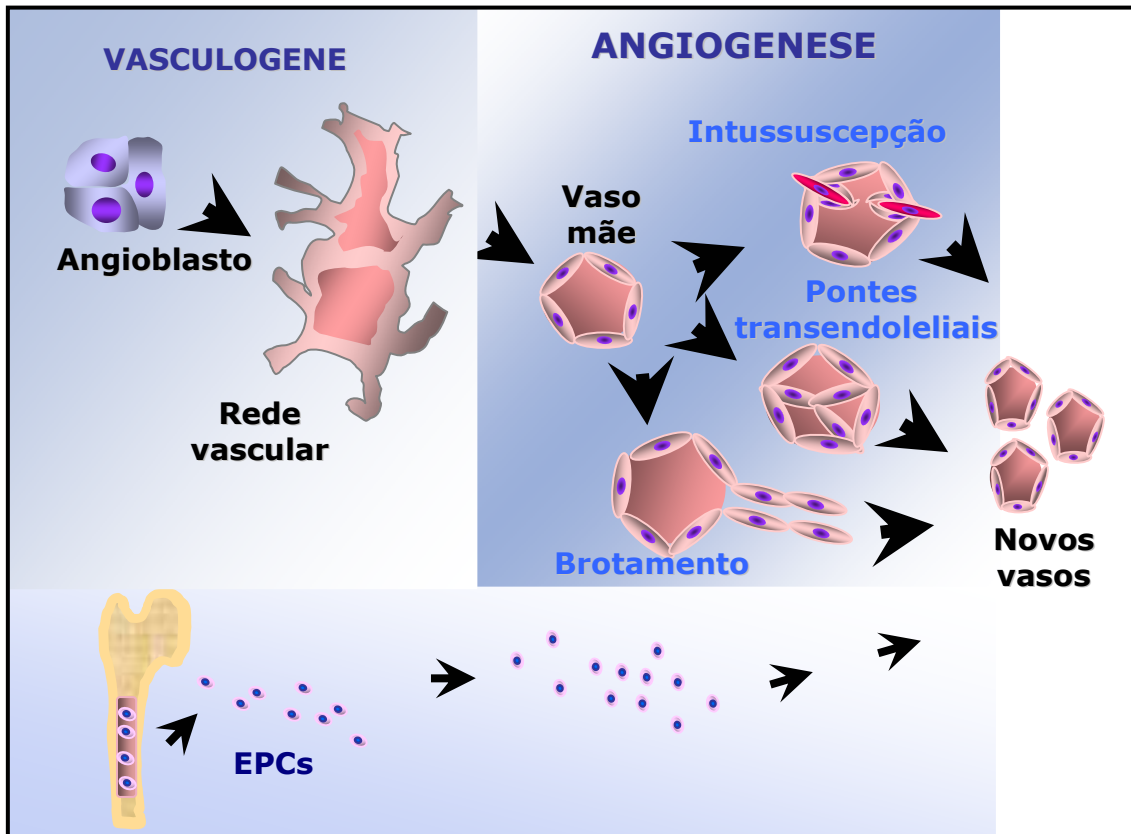


FIGURA 2 - FORMAÇÃO VASCULAR. O esquema mostra a vasculogênese, os tipos de angiogênese: brotamento, o mais freqüente; intussuscepção e pontes trans-endoteliais e o recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea. Modificado de Carmeliet, P. (2003). *Nat Med*, **6**(4), 389-395.

Embora as células endoteliais sejam o foco da atenção, elas sozinhas podem iniciar, mas não completar a angiogênese. As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento vascular. Essas células estabilizam o vaso nascente através da inibição da migração e da proliferação endotelial, e por estimular a produção de matriz extracelular. Elas proporcionam controle homeostático e protegem o novo vaso contra rupturas ou regressão (Carmeliet, 2000).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e VEGF, degradação da membrana basal por metaloproteinasas, perda das

junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendothelias (FIG. 3) (Jain, 2003).

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle com fatores angiogênicos e antiangiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorrerá quando esta relação for inversa. Como exemplo de fatores angiostáticos temos os pericitos, vários componentes da matriz extracelular como endostatina (O'Reilly et al., 1997) e tumstatin (Maeshima et al., 2000), fragmentos de colágeno tipo XVIII (matriz extracelular - MEC) e IV (membrana basal) respectivamente, trombospondina e de fatores pro-angiogênicos, a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF- α), quimiocinas, angiogenina, células inflamatórias (D'amore & Thompson, 1987; Bernardini et al., 2003).

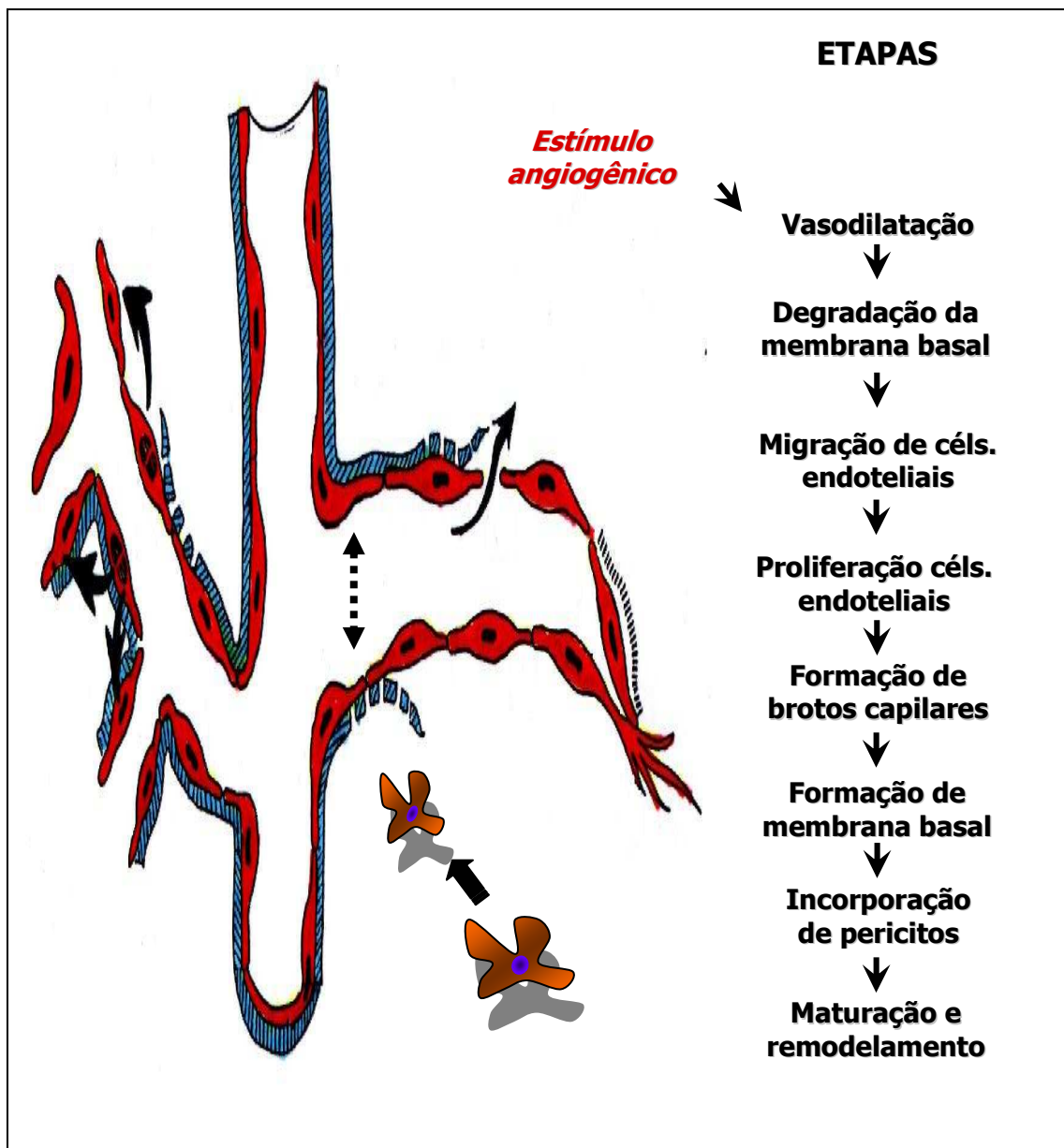


FIGURA 3- ETAPAS DA ANGIOGÊNESE. Modificado de Robbins & Cotran. Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed.

Em circunstâncias normais a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização de feridas; regeneração de órgãos; no sistema reprodutor feminino na maturação do folículo ovariano, na formação do corpo lúteo, na regeneração do

endométrio após o ciclo menstrual, na implantação do ovo e na formação da placenta. A angiogênese também é um fator importante em vários processos patológicos como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, na psoríase, obesidade, aterosclerose, isquemia, osteoporose, e outras (Reynolds et al., 1992; Folkman, 1995; Burke & DeNardo, 2001; Carmeliet, 2003; Hoeben et al., 2004).

1.3 Inflamação

A inflamação é uma reação complexa a vários agentes, que consiste de respostas vasculares, celulares (migração e ativação de leucócitos) e reações sistêmicas. A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo. Os tecidos, células e outros componentes envolvidos na inflamação, incluem o fluido e as proteínas do plasma, as células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas), os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos) (Kumar et al., 2005).

As reações vasculares e celulares da inflamação são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou de células plasmáticas e são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. Esses mediadores agem solitariamente, em conjunto ou em seqüência, amplificando a resposta inflamatória e influenciando sua evolução. Células e tecidos necróticos também podem desencadear a formação de mediadores da inflamação (Kumar et al., 2005).

As reações inflamatórias podem ser desencadeadas por vários estímulos, infecções, trauma, agentes físicos e químicos, necrose, corpos estranhos e reações imunológicas (Kumar et al., 2005).

Os patologistas costumam classificar a inflamação em aguda e crônica de acordo com as características morfológicas observadas. As principais características da inflamação aguda são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação crônica está associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular, e fibrose. A inflamação termina quando o estímulo é eliminado e os mediadores secretados são destruídos ou dispersos. Existem também mecanismos antiinflamatórios ativos que modulam a resposta e evitam que ela seja exacerbada (Kumar et al., 2005).

No decorrer do processo inflamatório, fase crônica, é geralmente observada tentativas de cicatrização pela substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo. Isso é efetuado através da proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e por fibrose. A cicatrização, bem como a regeneração são processos de reparo. A regeneração ocorre em tecidos com alta capacidade proliferativa enquanto, suas células tronco não forem destruídas, permitindo a esses tecidos renovarem-se continuamente e regenerarem-se após uma lesão. A cicatrização é, em geral, uma resposta fibroproliferativa em tecidos incapazes de regeneração. Nos processos de reparo a matriz extracelular (MEC) tem importantes funções atuando como fonte de fatores de crescimento, é importante para as interações célula-célula e também funciona como suporte para a adesão, migração e proliferação celular. A síntese e degradação da MEC acompanham a morfogênese, a cicatrização de feridas e os processos fibróticos crônicos, bem como o desenvolvimento tumoral e as metástases (Kumar et al., 2005).

1.4 Citocinas e quimiocinas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias

As citocinas são polipeptídeos mediadores locais, envolvidos em vários processos biológicos importantes tais como imunidade e inflamação. As citocinas participam da imunidade inata, apresentação de antígeno, diferenciação de células da medula óssea, ativação e recrutamento celular, expressão de moléculas de adesão, regulação do crescimento e diferenciação celular, influenciam a implantação do embrião e o desenvolvimento fetal, e podem ser importantes em doenças não imunológicas (Feldmann et al. 1996; Müller, 2002; Borish & Steinke, 2003).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina, considerada como um dos mais importantes fatores proangiogênicos. Ele, também potencia o aumento de permeabilidade microvascular que pode preceder ou acompanhar a angiogênese (Hoeben et al., 2004).

O VEGF foi purificado em 1983 por Senger et al. e, posteriormente, por Ferrara & Henzel e Plouet et al em 1989. Possui atividade mitogênica de células endoteliais com grande afinidade por seus sítios de ligação, os receptores nas células endoteliais flk-1 eflt-1 (Leung et al., 1989; DeVries et al., 1992). O VEGF pode ser expresso por diferentes tecido, incluindo cérebro, rim, fígado e baço, além de muitos tipos celulares (Veikkola & Alitalo, 1999; Hoeben et al., 2004).

A transcrição do mRNA do VEGF pode ser induzida pela secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β e IL-1 β (Veikkola & Alitalo, 1999; Akagi et al., 1999; Enholm et al., 1997). Os níveis de VEGF liberados são regulados, principalmente, pela tensão de oxigênio no tecido.

Condições geradoras de hipóxia induzem, rapidamente, um aumento da produção e secreção de VEGF local (Ferrara & Alitalo, 1999).

Em experimentos realizados *in vivo* o VEGF mostrou atuar na regulação da permeabilidade vascular, importante passo para a iniciação do processo angiogênico. Durante a embriogênese, o VEGF também está presente promovendo a diferenciação e proliferação de células endoteliais e a formação de vasos imaturos (Dvorak et al., 1995).

Além de sua função durante a angiogênese, o VEGF possui papel crucial em algumas condições fisiológicas do organismo. Ele é detectado no ovário durante a formação do corpo lúteo, no útero durante proliferação endometrial e no sítio de implantação do endométrio (Ferrara et al., 1998). Elevados níveis de VEGF são detectados durante a fase proliferativa de processos de cicatrização de feridas (Nissen et al., 1998). O VEGF é igualmente detectável em áreas onde as células endoteliais permanecem quiescentes, tais como pulmão, coração e cérebro, sugerindo que esta citocina possui papel de fator de sobrevivência nestes tecidos (Liekens et al., 2001).

O fator de necrose tumoral (TNF) é representado por dois polipeptídeos homólogos derivados de fagócitos mononucleares e linfócitos (TNF- α e TNF- β). TNF também é produzido e secretado por neutrófilos, células natural *killers* (NK), células endoteliais, mastócitos e algumas células tumorais (Sherry & Cerami 1988; Borish & Steinke 2003).

Os TNF- α e β exercem suas atividades biológicas através de ligação a dois distintos receptores na membrana celular – TNFR1 (55-60 kDa) e TNFR2 (70-80 kDa) – com afinidades similares, produzindo efeitos semelhantes mas não idênticos (Tartaglia & Goeddel, 1992; Grell et al., 1995) e ativando várias vias de sinalização (Gupta, 2002). O TNF- α sinaliza também pela ativação de NF- κ B (fator de

transcrição nuclear κ B – fator essencial para a sobrevivência de muitos tipos celulares) (Gupta, 2002).

O TNF é um dos principais mediadores das reações inflamatórias, imunológicas, e patofisiológicas (Fiers, 1991). Essa citocina induz imunidade anti-tumoral através de efeitos citotóxicos diretos sobre as células cancerosas e pela estimulação da resposta imune anti-tumor. Ela também interage com as células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1, moléculas de adesão da célula vascular (VCAM)-1 e E-selectina, permitindo desta forma o acesso dos granulócitos ao local da inflamação. O TNF é um potente ativador de neutrófilos, mediando a aderência, quimiotaxia, degranulação e a explosão respiratória. É responsável pela caquexia observada em infecções crônicas e no câncer; além de induzir permeabilidade vascular, têm efeito inotrópico negativo e, é um importante mediador do choque séptico (Sedgwick et al., 2000; Borish & Steinke, 2003).

O fator de necrose tumoral induz a produção de autacoides em células endoteliais, incluindo prostanoídes (particularmente PGI₂), fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico (NO). E a síntese de uma proteína semelhante a elastase é o efetor final da produção de PAF. O PAF expresso na superfície da célula endotelial coopera com moléculas de adesão na transmigração leucocitária e pode preparar ou ativar células circulantes ou as próprias células endoteliais. O PAF produzido pelo endotélio também é um mediador secundário da angiogênese induzida por citocinas inflamatórias (Mantovani et al., 1997). O TNF e a IL-1 também induzem a produção de várias citocinas pelas células endoteliais, incluindo variadas quimiocinas, fatores estimuladores de colônias (CSFs), IL-6 e a própria IL-1 (Mantovani et al., 1997).

As células endoteliais expressão TNFR1 e 2, sendo o último o mais abundante na membrana celular. O TNFR1 é expresso em baixas concentrações na membrana, mas é no total mais abundante, e é detectável principalmente no complexo de Golgi e nos vacúolos citoplasmáticos (Bradley et al., 1995). O TNF ativa as células endoteliais predominantemente via o receptor TNFR1 (Paleolog et al., 1994). A forma transmembrana do receptor TNFR2 é o primeiro ligante do TNF e, pode ter um importante papel nas interações entre as células endotelial e monócito (Grell et al., 1995).

Fràter-Schröder et al., 1987 demonstraram *in vitro* que o TNF- α inibe a proliferação de células endoteliais de aorta e de capilares cerebrais e as células musculares lisas. Entretanto, em ensaios na córnea de coelhos e na membrana corion-alantoica esta citocina demonstrou um efeito estimulador da angiogênese (Fràter-Schröder et al., 1987; Leibovich et al., 1987).

O TNF- α é tido como um mediador de sobrevivência para vários tipos celulares incluindo as células endoteliais e, esse efeito deve-se a ativação do fator NF- κ B (Gupta, 2002; Clermont et al., 2003; Peiretti et al., 2005). Entretanto, ele também pode induzir apoptose (Gupta, 2002) .

O TNF- α aumenta a expressão de VEGF e dos receptores desta citocina nas células endoteliais (Balkwill & Mantovani, 2001). Usando implantes subcutâneos de esponja em animais geneticamente deficientes para o receptor TNFR1, foi observada diminuição da angiogênese e dos níveis de VEGF (Barcelos et al., 2005). Estes achados exemplificam as propriedades angiogênicas atribuídas ao TNF.

O TNF- α tem sido detectado em células malignas e em células do estroma de tumores de ovário, mama, próstata, bexiga, cólon, linfomas e leucemias. O TNF tem um papel paradoxal na evolução e

no tratamento de tumores malignos. Quando ele é administrado em altas doses e localmente observa-se destruição seletiva dos vasos sanguíneos tumorais e possui poderosa ação anti-cancer. Entretanto, quando produzido cronicamente, o TNF pode agir como um promotor tumoral endógeno, contribuindo para o remodelamento tecidual e o desenvolvimento do estroma necessários ao crescimento e disseminação do tumor (BalkWill, 2002).

As quimiocinas formam uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, de baixo peso molecular (8-12 kDa). Elas são reconhecidas por seus efeitos de ativação e diferenciação celular, por estimular o movimento dos leucócitos e regular sua migração do sangue para os tecidos. Atualmente, tem sido reconhecido seu papel em muitos processos biológicos tais como angiogênese, produção de colágeno, hematopoese, organogênese, proliferação celular, polarização linfocitária, apoptose, metástase e defesa (Gerard & Rollins, 2001; Murakami et al., 2004; Esche et al., 2005).

As quimiocinas dividem-se em quatro sub-grupos com base no número e no espaçamento entre os seus dois primeiros resíduos de cisteína conservados na posição amino-terminal. São classificadas como CC, CXC, CX3C e C; onde "X" é um aminoácido (Bernardini et al., 2003; Zimmermann et al., 2003).

Quimiocina CX3C, possui três aminoácidos inseridos entre as duas primeiras cisteínas, tem como representante a fractalcina que, pode existir sob duas formas, ancorada à membrana celular, e pode ser induzida em células endoteliais por citocinas inflamatórias, e como glicoproteína (Bazan et al., 1997).

As quimiocinas C não possuem duas das quatro cisteínas conservadas (1ª e 3ª). A linfotactina é membro dessa família. (Kelner et al., 1994).

As quimiocinas CC exibem os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes. Está incluída neste grupo a Proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1/JE) atualmente denominada CCL2 (Kunkel et al., 1995).

As quimiocinas CXC têm um resíduo de aminoácido entre os dois primeiros resíduos de cisteína e atuam principalmente nos neutrófilos. Esse grupo pode ser subdividido baseado na presença ou ausência da seqüência de aminoácidos Glu-Leu-Arg (ELR) precedendo o primeiro resíduo de cisteína. O motivo ELR é importante na regulação da angiogênese induzida por quimiocinas CXC (Kunkel et al., 1995, Addison et al., 2000).

As quimiocinas medeiam suas atividades por ligação a receptores na superfície celular acoplados à proteína G. Tais receptores, denominados CXCR ou CCR, contêm sete alças transmembrana e são chamados receptores serpentinos (Premack & Schall, 1996).

Vários estudos têm mostrado que as quimiocinas CXC exercem importante papel na angiogênese associada aos processos inflamatórios, de reparo e tumorais (Szekanecz et al., 1998; Moore et al., 1998; Belperio et al., 2000). Tem sido demonstrado que as quimiocinas CXC que contém o motivo ELR (ELR⁺) são potentes indutores da angiogênese *in vivo*. Em contraste, as CXC que perderam o motivo ELR (ELR⁻) são potentes fatores angiostáticos (Strieter et al., 1995). O KC, o homólogo murino da GRO- α humana, é uma das quimiocinas CXC-ELR que se liga ao receptor CXCR2. Foi demonstrado que esse receptor está envolvido na angiogênese *in vivo* induzida por quimiocinas CXC ELR⁺ (Addison et al., 2000).

No início dos anos 70 foi observado que em sobrenadantes de células mononucleares continham substâncias atrativas para monócitos e neutrófilos. Posteriormente um fator quimiotático para

monócitos foi identificado em sobrenadantes de cultura de células tumorais de camundongos e de humanos e denominado fator quimiotático derivado de tumor (TDCF). TDCF foi o único ativo em monócitos mas não em neutrófilos e, tinha baixo peso molecular (12 kDa). Além disso, evidências sugeriram seu envolvimento na modulação de infiltração de macrófagos em tumores murinos e humanos. Uma molécula com especificidade celular e propriedades físico-químicas semelhantes foi identificada, independentemente, em sobrenadante de cultura de células musculares lisas. Alternativamente, o gene JE tinha sido identificado em fibroblasto como um gene indutor de PDGF. Em 1989, o MCP-1 foi purificado com sucesso de sobrenadantes de glioma, leucemia monocítica e de sarcoma, a molécula foi seqüenciado e clonada revelando sua relação de parentesco com o gene JE (Damme & Mantovani, 2005). JE é o homólogo murino de MCP-1.

O MCP-1 é essencial no recrutamento de monócitos, é quimiotática para células endoteliais humanas, induz in vivo a formação de vasos sanguíneos, sendo essa resposta angiogênica por ação indireta (via leucócitos) e direta (via receptor CCR2, presente na célula endotelial). Também, como essa quimiocina é abundantemente produzida em alguns tumores, ela pode contribuir diretamente para a progressão tumoral (Salcedo et al., 2000).

1.5 Neoplasia

O crescimento (multiplicação) e a diferenciação (especialização morfológica e funcional) celular são processos essenciais para os seres vivos. A multiplicação celular é indispensável durante o desenvolvimento normal dos organismos e necessário para repor as células que morrem pelo processo natural de envelhecimento. As

especializações morfológicas e funcionais permitem o desenvolvimento do organismo como um todo integrado. Esses dois processos recebem influências de um grande número de agentes internos e externos às células. Não é surpresa que, com certa frequência, surjam transtornos nos mecanismos que os controlam. A multiplicação e a diferenciação celular está sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Alterações nesse sistema regulatório resultam em distúrbios do crescimento, diferenciação ou de ambos ao mesmo tempo. As alterações do crescimento e da diferenciação celular, onde a proliferação é autônoma e, geralmente acompanhada de perda de diferenciação, é chamada neoplasia (Brasileiro-Filho et al., 2000).

Willis, R. A. em 1952 definiu as neoplasias como sendo uma *"massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos normais e persiste na mesma maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que originaram a mudança"*. A persistência do crescimento tumoral, com ausência de estímulo, é resultado de alterações genéticas hereditárias na célula tumoral progenitora. Estas alterações levam a proliferação excessiva e desregulada tornando-a autônoma (Kumar et al., 2005).

Do ponto de vista clínico, evolutivo e comportamental, as neoplasias são divididas em duas categorias: benignas e malignas. As neoplasias benignas em geral, têm suas células bem diferenciadas, as atipias celulares e arquiteturais são discretas, possui baixo índice mitótico, o crescimento tende a ser lento e expansivo, o tumor é bem delimitado e geralmente não recidivam após ressecção cirúrgica. As neoplasias malignas apresentam algumas características tais como alterações na expressão gênica com tendências à síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária, suas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células

normais, as células são mais resistentes a hipóxia, são mais indiferenciadas, tem menor adesão entre si, tem motilidade considerável, geralmente dão metástase, etc (Brasileiro-Filho, et al., 2000).

Todas as neoplasias têm como componentes básicos o parênquima constituído pelas células tumorais e o estroma, composto principalmente de vasos neoformados, células inflamatórias (principalmente macrófagos e linfócitos) e de tecido conjuntivo (células e matriz extracelular) (Dvorak, 1986). As células parenquimatosas determinam o comportamento, as conseqüências patológicas, o crescimento e a evolução do tumor. Entretanto, o tumor é criticamente dependente de seu estroma (Kumar et al., 2005).

Nos tumores malignos as células predominantemente encontradas no estroma são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, em alguns tipos tumorais também há eosinófilos, granulócitos, células natural-killer (NK) e linfócitos B. O número e o tipo de células que constituem o infiltrado inflamatório nos tumores sólidos, estão relacionados com a produção local de quimiocinas pelas células do tumor e do estroma. Por exemplo, as quimiocinas CC são determinantes importantes da infiltração de macrófagos e linfócitos em carcinoma humano de mama (Balkwill & Mantovani, 2001; Balkwill, 2004).

A indução de vasos sangüíneos na massa tumoral é um fenômeno complexo que envolve uma multiplicidade de fatores. O estímulo para a angiogênese tumoral é produzido diretamente pelas próprias células neoplásicas e em menor grau e indiretamente pelas células inflamatórias recrutadas no sítio tumoral (Eccles & Alexander, 1970; Russel et al., 1976; Talmadge et al., 1981).

Os vasos tumorais são caracterizados por apresentar uma organização caótica, diâmetros variados, são tortuosos, fenestrados, membrana basal descontínua, padrão anormal de crescimento, ausência de inervação e ausência de células murais ou associação anormal entre as células endoteliais e murais (Mattsson et al., 1977; Jain & Baxter, 1988; Bian et al., 2004). Outra diferença é a aparente ausência de sistema linfático para drenar o fluido intersticial, resultando em pressões intersticiais anormalmente elevadas (Boucher et al., 1990). Os tecidos tumorais possuem número significativo de shunts arteriovenosos. Esses shunts são responsáveis pela menor resistência ao fluxo, e facilitam a passagem direta de sangue do suprimento arterial para a drenagem venosa sem a passagem por capilares sanguíneos. Aproximadamente 30% do fluxo sanguíneo tumoral passa através de shunts. A ausência de musculatura lisa vascular acarreta sérios distúrbios no controle interno da microcirculação, devido à falta de ajustes vasomotores necessários para o fluxo sanguíneo normal no vaso. Desse modo, a circulação tumoral pode ser considerada como um sistema passivo, com a perda da capacidade de auto-regulação do fluxo sanguíneo em resposta a alterações na pressão de perfusão (Chaplin et al., 1991).

A presença de células inflamatórias nas neoplasias é vista, por alguns pesquisadores, como uma reação do organismo tentando controlar o crescimento desse tecido. Entretanto, a resposta inflamatória produzida pela presença de células tumorais é importante para o desenvolvimento neoplásico. Vários estudos têm mostrado a relação entre o influxo de células inflamatórias e o desenvolvimento tumoral (Eccles & Alexander, 1970; Russel et al., 1976; Talmadge et al., 1981).

Dentre as células infiltradas no estroma tumoral os macrófagos merecem destaque. A análise dos macrófagos associados aos tumores (TMA) sugere que essas células apresentam capacidade de

afetar o desenvolvimento do tumor de diferentes formas. Elas apresentam atividade citotóxica para as células tumorais mas, podem induzir neovascularização alterando desta forma a velocidade de crescimento tumoral e a formação de metástase (Balkwill & Mantovani, 2001). Os macrófagos produzem grande quantidade de fatores de crescimento pro e antiangiogênicos, enzimas proteolíticas e citocinas (Polverini, 1997), também apresentam atividade pró-coagulante que indiretamente, contribui para a formação vascular.

Os tumores expressam uma extensa rede de quimiocinas e de seus receptores. É característica dos tumores uma produção desregulada dessas substâncias e da sinalização e expressão anormal de seus receptores. As quimiocinas associadas ao tumor participam de pelo menos cinco processos biológicos básicos, tanto em tumores primários quanto em metástases. Elas controlam a infiltração de leucócitos no tumor, manipulam a resposta imune tumoral, regulam da angiogênese, atuam como fatores de crescimento e sobrevivência de forma autócrina e parácrina e controlam a movimentação das células tumorais (Balkwill, 2003).

Alguns trabalhos mostram que as células tumorais são capazes de desenvolver mecanismos, para evitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, impedindo assim, uma resposta imune antitumoral eficaz (defeito na apresentação de antígeno, baixa ou nenhuma expressão de MHC classe I e II) (Fecchio et al., 1990). Um desses mecanismos utilizado pelas células tumorais é a secreção de níveis elevados de VEGF (produzido por quase todos os tumores) para a corrente sanguínea, promovendo a ligação desta citocina a células progenitoras do sistema hematopoiético, através de receptores específicos (Flt-1) e, inibindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B nestas células. Esta inibição leva a maturação funcional defeituosa das células dendríticas e, pode assim contribuir

para a indução de deficiência imunológica observada em pacientes com câncer (Oyama et al., 1998; Gabrilovich et al., 1998).

As principais conseqüências das neoplasias se devem ao seu tamanho, à sua localização, à sua capacidade de produzir substâncias biologicamente ativas e no caso dos cânceres têm-se ainda os múltiplos efeitos devastadores provocados na sua sede e a distância. Os efeitos locais dependem em grande parte da sede e das dimensões do tumor, podendo causar obstruções e suas conseqüências naturais, compressão e deslocamentos de órgãos ou estruturas e também ulcerações e hemorragias. Os efeitos sistêmicos estão relacionados com transtornos metabólicos devido à produção de substâncias tóxicas ou de ação fisiológica. Neoplasias de glândulas endócrinas podem causar tanto redução como aumento de hormônios levando respectivamente a hipofunção e hiperfunção glandular. O estado de consunção progressiva, fraqueza generalizada, anemia e emagrecimento acentuado que caracterizam o estado de caquexia é uma das conseqüências mais dramáticas dos cânceres. Pacientes cancerosos desenvolvem hipercatabolismo. Acredita-se que o TNF- α e o IFN- γ liberados por macrófagos ou pelas células neoplásicas tenham papel importante no aumento do catabolismo nos tecidos muscular e adiposo. Outro efeito sistêmico são as síndromes paraneoplásicas que por vezes são a primeira manifestação de um câncer e podem ser até as responsáveis pela morte do paciente. Nesta categoria estão incluídas como alterações principais a produção ectópica de hormônio, alterações hematológicas (eritrocitose, anemia, hipercoagulabilidade), manifestações neuromusculares (degeneração cerebelar, demência, neuropatias periféricas, manifestações semelhantes às da polimiosite e miastenia *gravis*) e outras como osteoartropatia hipertrófica e *acanthosis nigricans* (Brasileiro-Filho, et al., 2000; Kumar et al., 2005).

1.6 Neoplasias experimentais

Os avanços na ciência, na oncologia e na biologia molecular têm contribuído para a melhoria no diagnóstico, pesquisa e nas estratégias terapêuticas dos tumores. O desenvolvimento de modelos experimentais de tumores, muito tem contribuído para o estudo de seu desenvolvimento, mecanismos envolvidos nas metástases e no teste de substância com ação antineoplásica. Na área da oncologia, diversos modelos experimentais têm sido propostos, buscando atender a esses objetivos. De modo geral, quer para os estudos básicos de biologia tumoral, quer para a investigação de novas modalidades terapêuticas (cirúrgica, medicamentosa, radioterápica) dispõem-se hoje de uma variedade de tumores experimentais, já catalogados. Dentre eles alguns exemplos são os tumores ascítico e sólido de Ehrlich (Guerra, 1983), tumor de Walker (Moraes et al., 2000), melanoma (B16 e F10) (Alterman et al., 1985), tumor hepático experimental (VX-2) (Hossne, 2002), tumor de cólon (MC38, MC32a e CT 26) (Wainstein, 2001; Pozzi, 2004).

Os tumores experimentais são, na maioria, de animais e podem ser mantidos em laboratório, através de cultura de células (tumor de Walker, melanoma, cólon), de transplantes em hospedeiros susceptíveis (tumor de Ehrlich) e/ou induzidos por substâncias químicas (tumor de tireóide) (Wollman, 1999).

Os primeiros transplantes tumorais realizados com sucesso datam do século XVIII, quando Hanau transplantou um tumor de vulva para o escroto de um rato de mesma linhagem (Stewart, 1959). Posteriormente, Morau (1894) transplantou tumores mamários de fêmeas de camundongos para outros tipos de animais. Tumores transplantáveis consistem em uma importante ferramenta utilizada no ramo da oncologia para o estudo da fisiopatologia tumoral (crescimento e replicação celular, invasão e metastatização,

neoformação vascular e estudos de citogenética) e para melhor elucidação das alterações imunológicas observadas no organismo do hospedeiro. Atualmente, os modelos de tumores experimentais transplantáveis têm sido exaustivamente utilizados para realização de testes de substâncias potencialmente nocivas às células ou estruturas tumorais.

1.6.1 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi primeiramente descrito por Paul Ehrlich em 1906. É uma neoplasia de camundongos, transplantável constituída de células de origem epitelial, um adenocarcinoma de mama (Ehrlich, 1906).

O tumor de Erlich desenvolve-se em cavidades serosas como a abdominal e pleural, bem como em músculos; não se observa, porém, crescimento em vísceras parenquimatosas, como fígado. As formas ascítica ou sólida de seu crescimento ocorre conforme o local de sua inoculação (Wainstein, 1999). Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal. Essa forma tem como característica grande acúmulo de fluidos no abdome (ascite) e uma baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação) (Fecchio, 1990; Hossne, 2002).

Segundo Dagli, 1989 o tumor de Ehrlich sólido pode ser descrito morfológicamente com células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares.

O tumor de Ehrlich possui capacidade de crescimento em quase todas as linhagens de camundongos, provavelmente porque durante o processo de transformação maligna suas células perderam os antígenos de histocompatibilidade H-2 (Carry, 1979). É um tumor considerado pouco imunogênico, pois não expressa moléculas de MHC de classe II. Devido a sua baixa imunidade, esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, com proliferação celular acelerada e invasão de tecidos adjacentes.

A virulência do tumor de Ehrlich não é alterada pela linhagem do camundongo utilizada, porém cada linhagem apresenta uma reação imunológica específica à presença do tumor, fato que altera a sobrevida de acordo com a linhagem utilizada (Kodama & Kodama, 1975).

O tumor de Ehrlich é bom modelo para estudos envolvendo citologia, por crescer na forma ascítica, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas (Hossne, 2002).

1.6.2 Tumor de Cólon

O tumor de cólon é um excelente modelo de tumor para avaliação de novas estratégias (McWilliams & Erlichman, 2005). É um dos melhores modelos para o estudo da angiogênese tumoral. Um grande número de fatores angiogênicos, envolvidos na modulação do crescimento vascular, tem sido identificados no câncer de cólon, por exemplo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), b-FGF (fator de crescimento epidermal básico), PD-ECGF (fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaquetas), IL-8, Ang-1 e 2 (angiopoetina 1 e 2), angiogenina e TGF- α e β (fator de necrose tumoral alfa e beta) (Folkman, 1995; Hsu et al., 1995; Takahashi et al., 1996; Ahmad et al., 2001).

O VEGF e PD-ECGF estão relacionados com a angiogênese e a progressão do tumor de cólon. Vários estudos têm mostrado a participação do VEGF na progressão do tumor de cólon de um fenótipo não maligno para o maligno (Shiraishi et al., 1995; Wong et al., 1999; Lee et al, 2000).

Os níveis de VEGF eram mais altos em carcinomas, seguido por adenomas e extremamente baixo em mucosa normal sem neoplasia. A quantidade de vasos e a expressão de VEGF em tumor de cólon humano eram mais altas nos tumores primários metastáticos que nos não metastáticos (Takahashi et al., 1995).

1.7 Angiogênese na inflamação e no desenvolvimento tumoral

A cicatrização de feridas e o desenvolvimento tumoral são processos análogos em vários aspectos. A produção de estroma (Haddow, 1972; Dvorak, 1986), e a formação de capilares (Warren, 1979) são processos similares, também muitos fatores de crescimento derivados de macrófagos e mediadores da angiogênese no processo de cicatrização de feridas também têm sido isolados de várias linhagens de tumores humanos e de animais. Assim tornou-se claro, que os mesmos fatores de crescimento que tem um papel chave no processo tumoral maligno são também expressos fisiologicamente por células que medeiam o processo inflamatório e de reparo, tais como, plaquetas, macrófagos, fibroblastos e linfócitos (Sporn & Robert 1986; Arnold & West, 1991).

Os elementos do estroma em ambos os processos tem composições similares. O tecido de granulação como o estroma tumoral forma-se inicialmente com o aumento da permeabilidade vascular, devido à ação do VEGF, levando a exudação e deposição de proteínas plasmáticas como fibrinogênio, fibronectina plasmática, e

plasminogênio, na matriz extracelular servindo como um estroma provisório para a migração de monócitos/macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Em ambas as situações o gel de fibrina-fibronectina é degradado e transformado em tecido de granulação e eventualmente em um colágeno denso e relativamente acelular (Dvorak, 1986).

A cicatrização de feridas não pode ocorrer sem angiogênese (os vasos compreendem mais de 60% do tecido de granulação) (Arnold & West, 1991) e o crescimento tumoral é dependente de angiogênese (Folkman, 1971, Jain, 1990). Na cicatrização, um abundante suprimento sanguíneo é necessário para satisfazer a grande demanda metabólica local devido ao debridamento e fibrogênese e, o papel dos vasos é maior que o de nutrir, as células endoteliais também organizam e regulam a cicatrização (Arnold & West, 1991). A angiogênese nos dois processos ocorre por brotamento e pelo recrutamento de células precursoras endoteliais (EPCs) da medula óssea (Conway et al., 2001). Os novos capilares surgem principalmente de vênulas, arteríolas e capilares (Ausprunk & Folkman 1977). Esses vasos neoformados, independentemente de estímulo, são altamente permeáveis, não possuem membrana basal, e são freqüentemente tortuosos e com áreas de dilatações.

A angiogênese *in vivo* não ocorre isoladamente, com a presença de apenas um tipo de célula. A neovascularização fisiológica ou patológica está comumente associada com condições que mostram diferentes estágios de infiltrado de células inflamatórias (Griffioen & Molema, 2000). A relação entre a angiogênese e a infiltração leucocitária em crescimento tumoral, doenças cardiovasculares, inflamações crônicas e cicatrização de feridas têm atraído bastante atenção da comunidade científica nos últimos anos. Deste modo, alguns pesquisadores têm realizado modelos de co-cultura de

angiogênese nas quais células endoteliais crescem na presença de outras células que podem promover a neovascularização (por exemplo células cancerosas, queratinócitos e células da astrógliã) (Bernardini et al.; 2003).

A associação da angiogênese e da inflamação pode ser explicada pela habilidade das células endoteliais e dos leucócitos de responderem a um estímulo comum, tal como das quimiocinas. Por exemplo, durante a cicatrização de feridas, várias quimiocinas são expressas por plaquetas, células endoteliais, queratinócitos e leucócitos que se encontram temporal e espacialmente organizados para coordenar o recrutamento de células inflamatórias específicas para o sítio da inflamação. Durante um processo cicatricial, quimiocinas angiogênicas exercem tanto uma ação direta no endotélio quanto uma ação indireta em leucócitos que expressam fatores angiogênicos, com o intuito de induzir a neovascularização do tecido de granulação (Bernardini et al.; 2003).

Os mecanismos de inibição da angiogênese *in vivo* ainda não são completamente entendidos, mas podem envolver apoptose celular, inibição da sinalização dos receptores dos fatores de crescimento ou da expressão e/ou ativação das metaloproteínas (Lu et al., 1996; Jimenez et al., 2000; Nelson et al., 2000; Vincent et al., 2001; Benelli et al., 2002). Alternativamente, podem também inibir o recrutamento de leucócitos produtores de fatores angiogênicos ou interferir na atividade de fatores de crescimento. Já foi demonstrado que quando a expressão de quimiocinas angiogênicas é dificultada ou as quimiocinas angiostáticas são superexpressadas pelo uso de camundongos geneticamente modificados, o processo de cicatrização apresenta uma fase de granulação prolongada e uma diminuição da formação de novos vasos sanguíneos (Lu et al., 1996; Benelli et al., 2002).

Na ferida a formação de estroma e angiogênese são processos limitados, nos tumores eles são pobremente regulados persistindo enquanto as células tumorais estiverem presentes.

1.8 Animais nocaute

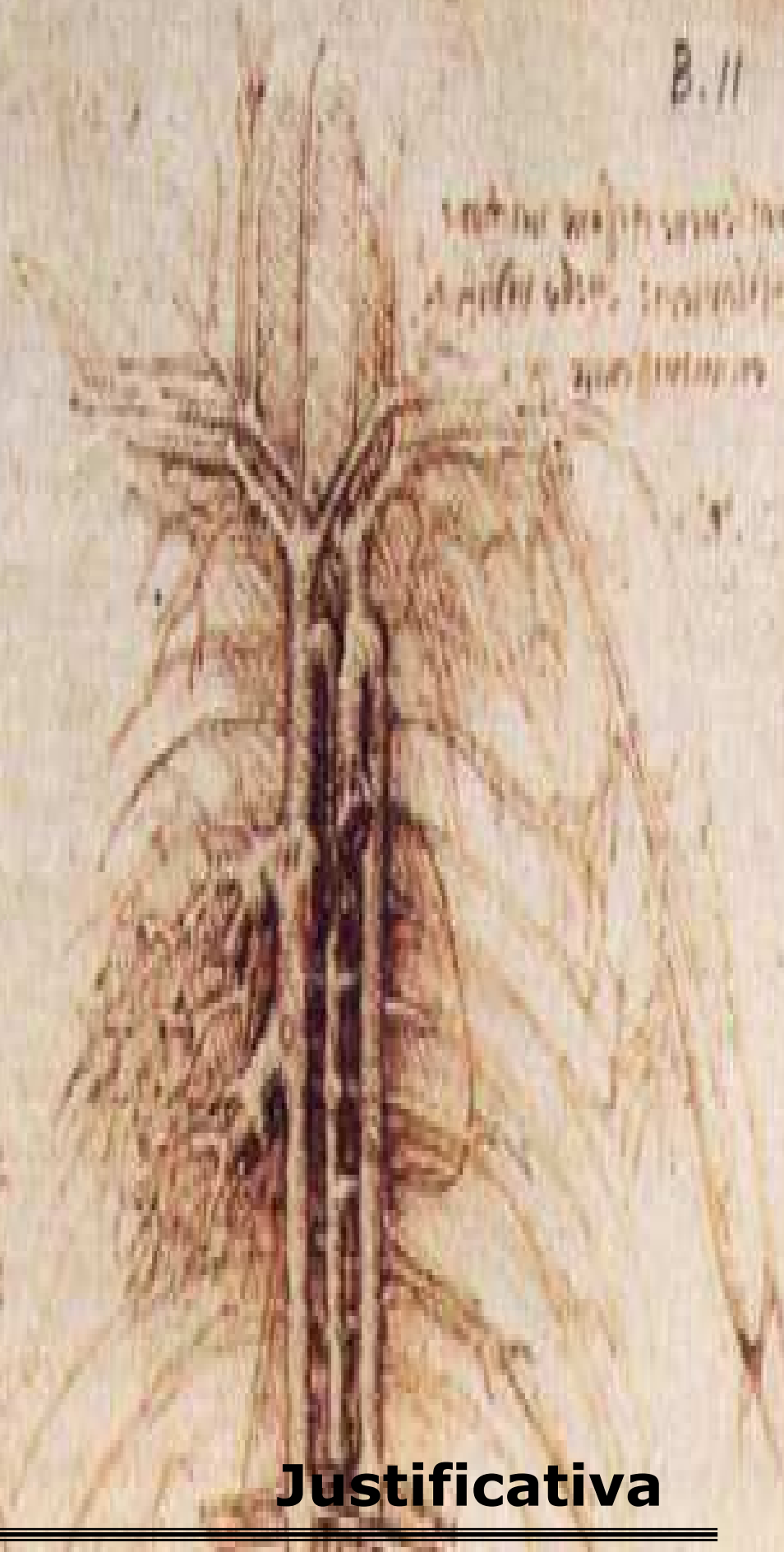
A manipulação genética de camundongos representa uma poderosa ferramenta experimental para o estudo da importância funcional de componentes gênicos específicos em sistemas fisiológicos complexos, além de possibilitar o estudo das conseqüências dessas alterações gênicas em várias condições patológicas.

Vários modelos de camundongos, com alterações genéticas no sistema vascular têm contribuído para elucidar processos biológicos complexos e, doenças cujo componente angiogênico é predominante, tais como aterosclerose (Carmeliet et al., 1998; Faraci & Sigmund, 1999).

Estudos em camundongos transgênicos com super expressão de receptores de PAF (PAFR) mostraram que estes animais desenvolvem tumores de pele após envelhecimento. Estes achados fornecem um novo *insight* sobre o papel do PAF na morfogênese da derme bem como sobre a atividade mitogênica do PAF e PAFR *in vivo* (Ishii et al., 1997).

Handwritten text in a script, possibly Telugu, located on the left side of the page.

Handwritten text in a script, possibly Telugu, located in the upper right quadrant of the page.



Justificativa

Handwritten text in a script, possibly Telugu, located at the bottom left corner of the page.

Handwritten text in a script, possibly Telugu, located at the bottom right corner of the page.

2. Justificativa

A proliferação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) é um processo necessário para o crescimento normal dos tecidos no desenvolvimento embrionário, na regeneração do endométrio, e na cicatrização de feridas. Nestas situações o processo é altamente controlado. Em contraste, a neovascularização persistente contribui para a manutenção e agravamento de um grande número de condições patológicas, incluindo processos inflamatórios crônicos e tumores sólidos (Folkman, 1995; Griffioen & Molema, 2000). Nestas duas condições, a neovascularização proporciona o suprimento sanguíneo e uma maciça infiltração de células inflamatórias essenciais para a manutenção da inflamação e crescimento do tecido.

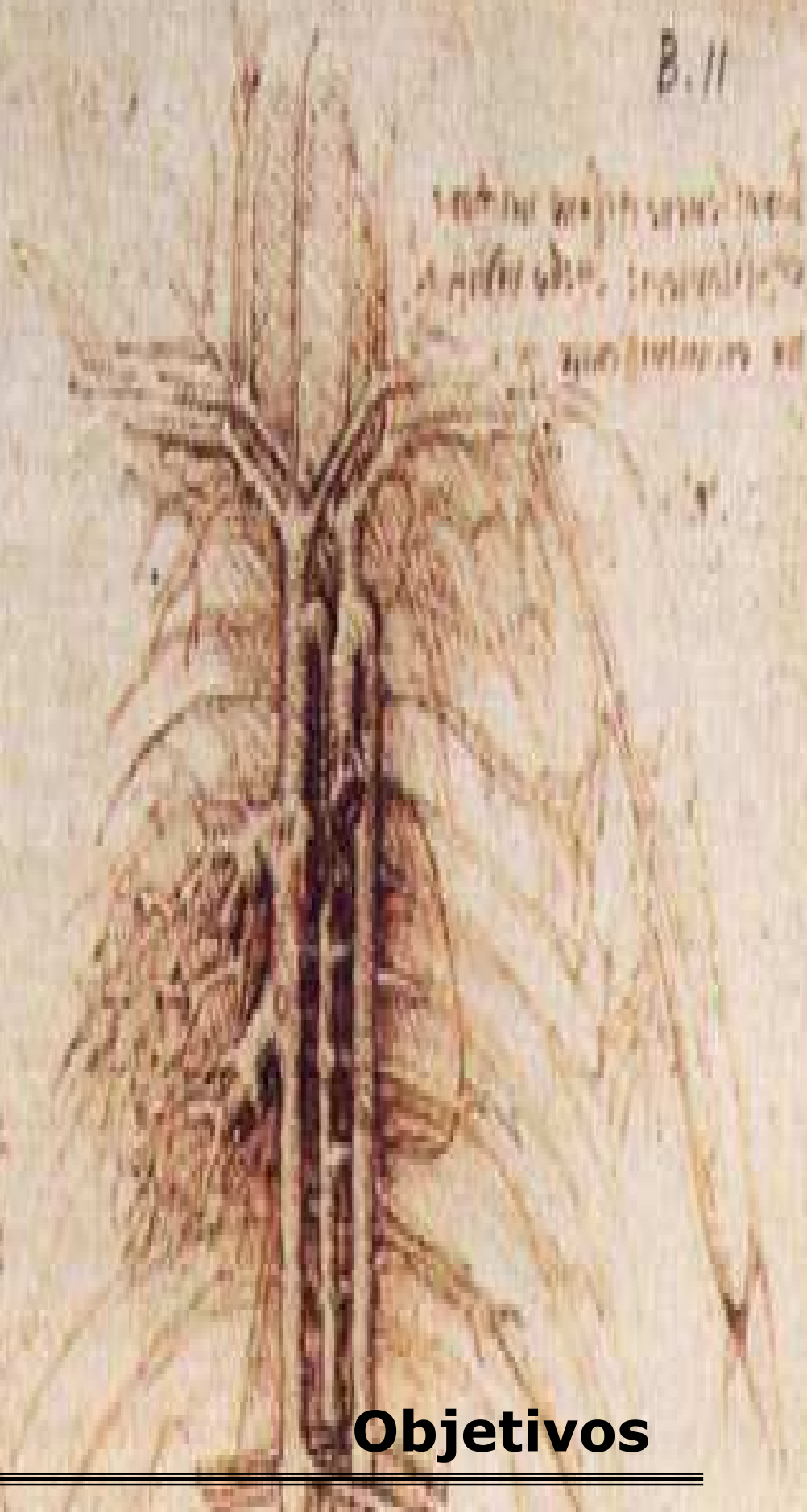
Muitos modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido usados para caracterizar os mecanismos envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos e no movimento ou migração de células, com a finalidade de desenvolver drogas e estratégias para controlar ou prevenir a patogênese dos tecidos. O implante subcutâneo de esponja, um modelo *in vivo*, induz uma resposta inflamatória crônica com formação de um tecido de granulação, constituído de tecido conjuntivo, intensa angiogênese e infiltração de células inflamatórias (Lage & Andrade, 2000). Esse modelo de esponja tem sido usado para o estudo de proteínas (citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas) e de mediadores não protéicos envolvidos na formação vascular e no aspecto inflamatório da formação do tecido de granulação (Ford et al. 1989; Andrade et al. 1992).

Neste projeto utilizamos camundongos com inativação do gene para o receptor do PAF – PAF receptor “knock out” (PAFR-KO) – para avaliar o efeito da atividade produzida por este mediador lipídico endógeno em dois modelos de angiogênese; o implante de esponjas e

o crescimento de células tumorais de Ehrlich na forma sólida e de células tumorais de cólon. No primeiro modelo foram avaliados a neovascularização, o acúmulo de células inflamatórias e a produção de citocinas. No segundo modelo, foram avaliados os parâmetros anteriormente mencionados para cada tumor e o seu crescimento. Espera-se que os resultados destes experimentos possam elucidar o papel do PAF associado ao desenvolvimento tumoral e cronicidade de processos inflamatórios.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located on the left side of the page.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located in the upper right quadrant.



Objetivos

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom left corner.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom right corner.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

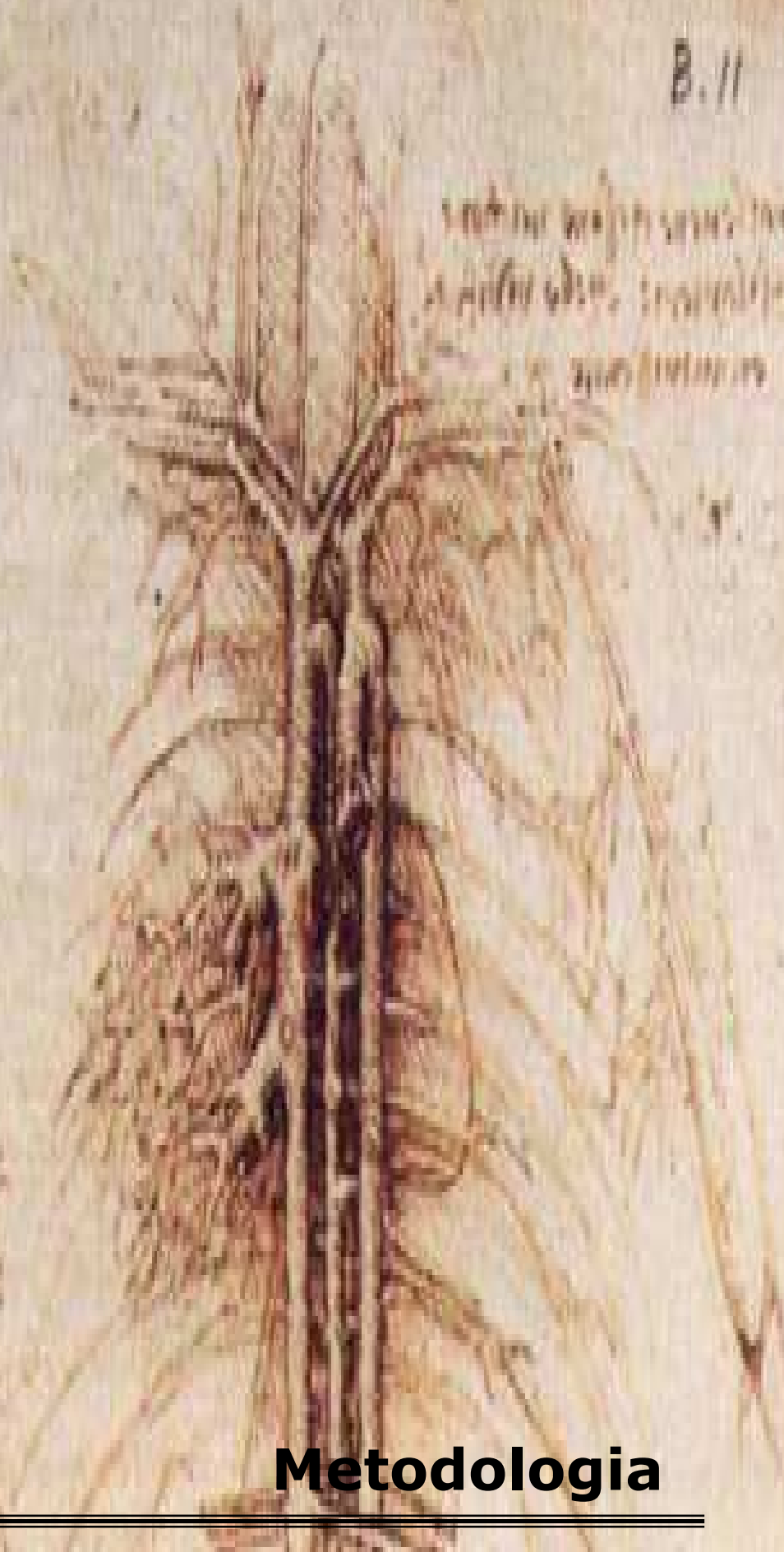
O PAF exerce papel importante como mediador do processo inflamatório e angiogênico, agindo diretamente sobre o recrutamento de células inflamatórias. O objetivo principal deste estudo é investigar o papel do PAF nos processos angiogênico, inflamatório e no desenvolvimento tumoral em camundongos deficientes para o receptor do PAF.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar através de parâmetros bioquímicos e histológicos a cinética da angiogênese e da inflamação em implantes de esponjas em camundongos PAFR-KO;
- Avaliar a participação de citocinas e quimiocinas pro-angiogênicas e pro-inflamatórias nestes processos;
- Caracterizar o desenvolvimento de tumores sólidos em animais PAFR-KO;
- Caracterizar o perfil da angiogênese e inflamação nestes tumores.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located on the left side of the page.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located in the upper right quadrant.



Metodologia



Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom left corner.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom right corner.

4. Metodologia

4.1. Modelos animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos machos com 7 a 8 semanas de idade (25-30g) Balb/c com deleção gênica (knock-out) para o receptor de PAF (PAFR-KO) e Balb/c selvagem como controle (WT). Os camundongos PAFR-KO foram produzidos segundo as descrições de Ishii et al., 1998. Estes animais knock-out foram procriados a pelo menos oito gerações em Balb/c. Eles foram fornecidos pelo Professor Takao Shimizu (Department of Biochemistry and Molecular Biology – University of Tokyo – Tokyo, Japan) e acasalados e mantidos na Unidade de Biociências do Instituto Gonçalo Muniz (Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA – Brasil).

4.2. Reatividade farmacológica da rede vascular cutânea ao PAF em camundongos PAFR-KO e WT

Os animais foram anestesiados com solução de 2,2,2-tribromoetanol (1 mg.kg⁻¹; i.p. Aldrich/ USA), e depilados antes dos procedimentos.

O teste utilizado para medir a reatividade farmacológica dos vasos foi o ensaio fluorimétrico (Andrade et al., 1997). Ele foi realizado primeiramente na pele do dorso de camundongos não implantados, usados como modelo, para estabelecer o fenótipo da resposta ao mediador (PAF) nos animais WT e PAFR-KO.

O ensaio fluorimétrico consiste na difusão da fluoresceína sódica (C₂₀H₁₀O₅Na₂ – peso molecular 376,27; Sigma) aplicada no tecido subcutâneo e sua posterior detecção na corrente sangüínea.

Esta medida reflete o fluxo sanguíneo local. Assim, a aplicação de substâncias exógenas vasoativas poderá alterar a intensidade de fluorescência na circulação sistêmica (Andrade et al., 1997; Lage & Andrade, 2000).

Uma solução estéril (10 μ L) de fluoresceína sódica (Sigma, USA) a 10% em salina foi injetada intradermicamente 2 minutos (tempo padranizado) após a aplicação de PAF (1 μ g) ou veiculo (10 μ L). Amostras de sangue (5 μ L) foram colhidas da veia da cauda do animal em intervalos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção do corante. As amostras de sangue foram misturadas a 1ml de salina a 0.9% (isotônica) e centrifugadas durante 5 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi usado para a determinação da fluorescência no comprimento de onda de excitação/emissão de 485/520 nm, usando o fluorímetro Jenway (modelo 6200). Os resultados foram expressos em termos de meia-vida ($T_{1/2}$; tempo necessário para a fluorescência alcançar 50% de seu pico na circulação sistêmica) (FIG. 4). O fluxo sanguíneo é inversamente proporcional a meia vida do pico de fluorescência na corrente sanguínea. Para estabelecer o efeito do mediador foram usados pelo menos três animais diferentes de cada grupo PAFR-KO e WT.

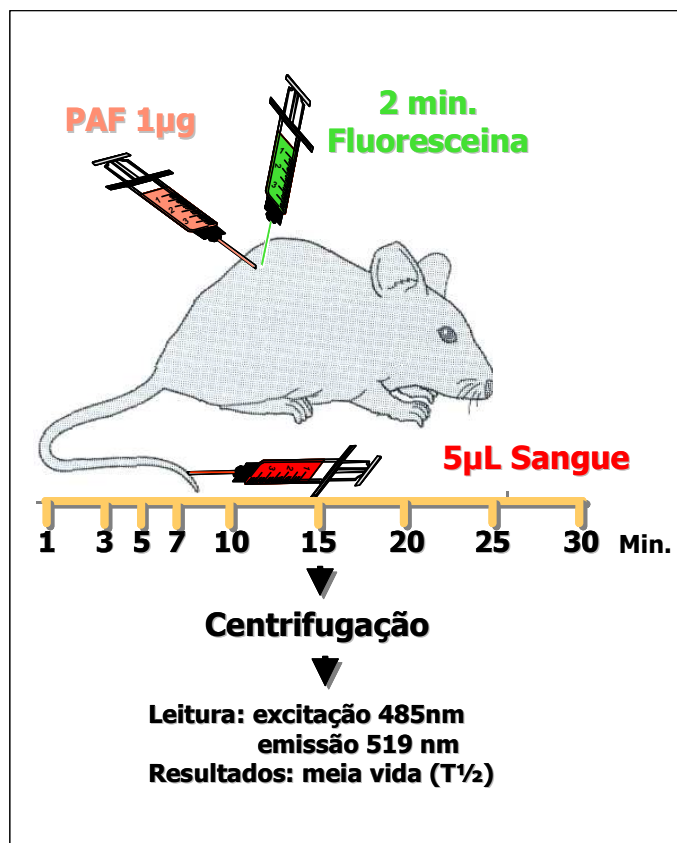


FIGURA 4 – REATIVIDADE VASCULAR AO PAF. Andrade et al., 1997.

4.3. Preparação e implantação de discos de esponja

Discos de esponja de poliéster-poliuretano (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) com 8 mm de diâmetro por 5 mm de espessura foram usados como matriz para o crescimento do tecido fibrovascular. Um tubo de polivinil (PE 20, Biovida, Brasil) (diâmetro interno 1,14mm; diâmetro externo 1,57mm; altura 12mm) foi preso com linha de sutura (Ethicon Ltd, UK) no centro de cada disco de tal forma que o tubo permanecesse perpendicular à face do disco de esponja.

A abertura superior do tubo foi vedada com uma rolha removível (massa de modelar). O implante, disco de esponja com a cânula, foi embebido em etanol 70% v/v por uma noite e, esterilizado

por fervura em água destilada durante 15 minutos antes de ser introduzido no animal. Antes da cirurgia, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (1 mg.kg^{-1} ; i.p. Aldrich/USA), o dorso depilado com máquina e na pele foi feita à assepsia usando etanol 70%. O implante foi colocado assepticamente em uma bolsa subcutânea, a qual foi feita por dissecção com uma tesoura de ponta romba, por 1cm ao longo de uma incisão na linha média dorsal. A cânula foi exteriorizada por contra abertura através de uma pequena incisão na bolsa subcutânea próxima ao pescoço. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos com uma dieta normal e água *ad libitum*. Os animais implantados foram sacrificados por deslocamento cervical no 7^o, 10^o e 14^o dias após serem implantados, e os discos de esponjas foram cuidadosamente removidos, dissecados do tecido aderente, pesados e analisados quanto ao processo angiogênico e inflamatório.

O implante subcutâneo de esponja (FIG. 5) é um modelo simples, de fácil reprodução, o procedimento é bem tolerado pelo animal e permite que a estrutura e função dos novos vasos possam ser avaliadas de várias formas, p.ex. morfometricamente (contagem do número de vasos, área relativa dos vasos na matriz), conteúdo de hemoglobina, medida do fluxo sanguíneo, quantificação da dose-resposta de inibidores e estimuladores angiogênicos (Dellian et al., 1996; Fan & Polverini, 1997; Jain et al., 1997; Hasan et al., 2004). Esse modelo pode ser usado para estudar a angiogênese inflamatória e tumoral (Andrade et al., 1987; Andrade et al., 1992a; Kim et al., 2001), bem com o desenvolvimento de sistemas reguladores vasoativos e a reatividade farmacológica da neovasculatura (Andrade et al., 1992a; Andrade et al., 1992b; Andrade et al., 1997).

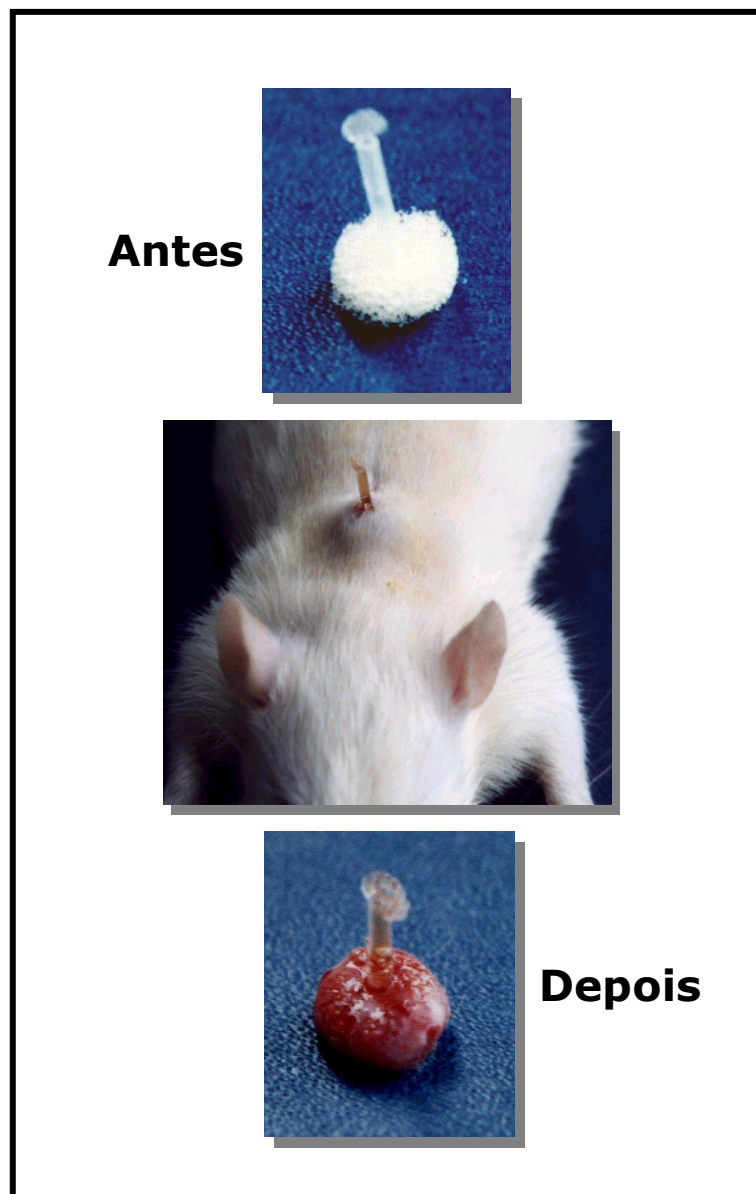


FIGURA 5 – MODELO EXPERIMENTAL DE IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE ESPONJA. A figura mostra a esponja antes e depois de implantada. Observa-se a matriz fibrovascular que se formou na esponja.

O modelo de implante de esponja também tem sido usado no estudo de técnicas de transferências de gene para estimular terapias angiogênicas (Wang et al., 2000). A cânula inserida na esponja tem a vantagem de um acesso fácil e direto para a administração de fármacos (Andrade et al., 1987; Hu et al., 1995).

4.4. Avaliação do efeito do UK 74505 na angiogênese induzida pelo implante

UK-74505 (1,4-dihidropiridina) é um antagonista potente e seletivo do PAF, de ação longa in vivo e irreversível in vitro (Alabaster et al., 1991; Parry et al., 1994; Souza et al., 2000). Este inibidor tem demonstrado ser extremamente ativo para várias espécies de animais quando administrado por via oral ou intravenosa (Alabaster et al., 1991).

UK 74505⁶ (30 mg/kg de peso) foi administrado oralmente a camundongos balb/c WT por 6 dias a partir do 1º dias após o implante, para verificar se o efeito deste antagonista promovia os efeitos da deleção gênica do receptor do PAF na angiogênese. Um grupo controle recebeu 50µL do veículo⁷ no mesmo protocolo. Os animais foram sacrificados no 7º dia, os implantes removidos e processados para a determinação da concentração de hemoglobina.

4.5. Manutenção das células tumorais

As células do tumor de cólon (linhagem CT26) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's essential médium) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FCS) e 1% de L-glutamina e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células foram repicadas quando atingiam um estado de confluência de 90%.

O tumor de Ehrlich foi mantido na forma ascítica através de repiques seriados nos camundongos Balb/c. Semanalmente, 300µl de fluido ascítico contendo aproximadamente 10⁷ células era retirado de animais portadores desse tumor e imediatamente inoculado na cavidade peritoneal de animais receptores de mesma linhagem. Após

⁶ UK 74505 é diluído em HCl a 0,1 M para o preparo da solução estoque. A solução de uso é obtida diluindo-se 10X a solução estoque em salina a 0,9%.

⁷ Veículo: solução com concentração final igual a do antagonista.

inoculação, os animais receptores eram mantidos no biotério do laboratório com água e ração *ad libitum* (FIG. 6).

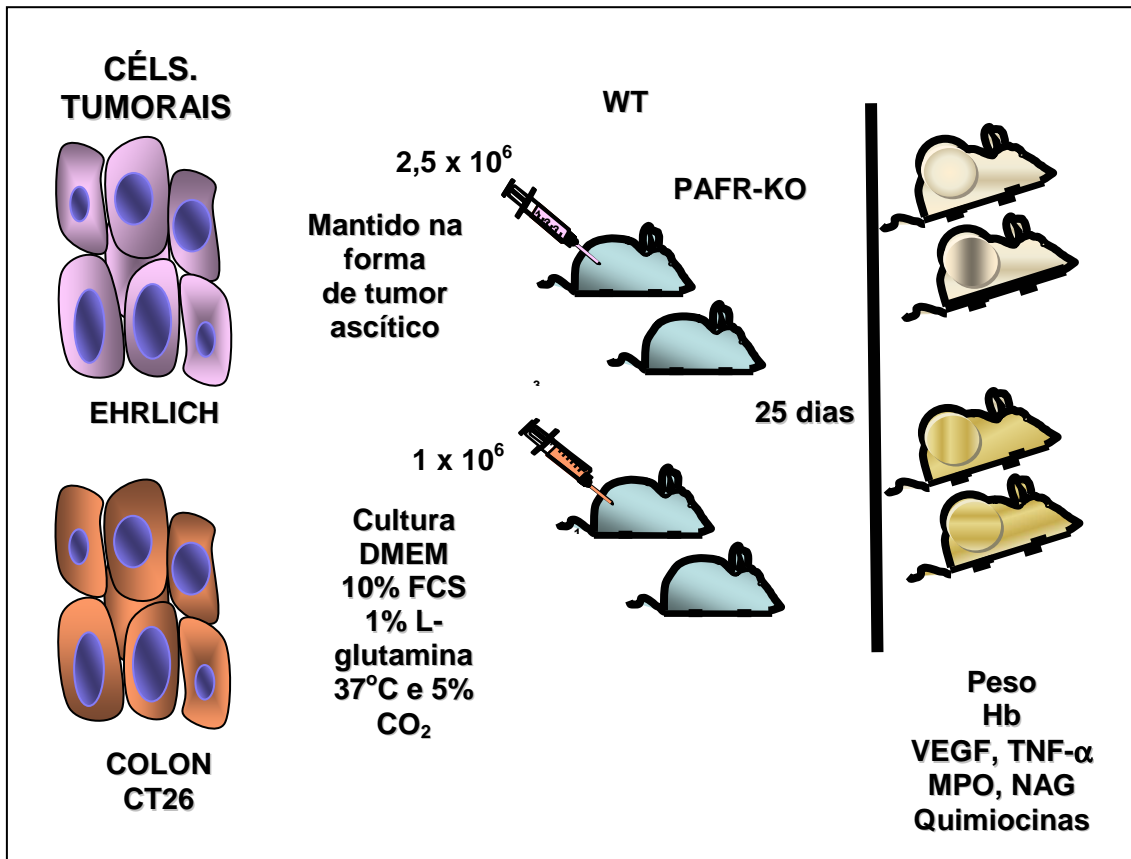


FIGURA 6 – ESQUEMA DA REPRODUÇÃO DOS TUMORES DO CÓLON E DE EHRlich SÓLIDO.

4.6. Contagem e viabilidade das células tumorais

Para a contagem de células tumorais, 1mL do fluido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal dos animais com tumor ascítico de Ehrlich ou de cultura de células no caso do tumor do cólon (CT26). Esta solução foi centrifugada durante 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo células tumorais foi lavado três vezes com salina estéril e novamente centrifugado. Após a última lavagem acrescentava-se 1mL de salina

ao precipitado e desta suspensão retirava-se 20 μL que foram diluídos 200 vezes com solução de Azul de Trypan a 0,025%. As células coradas em azul apresentavam lesões da membrana celular ou incapacidade de regular seu conteúdo intracelular e foram consideradas inviáveis. As células translúcidas (não coradas), foram consideradas viáveis. O número de células tumorais foi obtido através de contagem direta na câmara de Neubauer, usando objetiva de 10X. Foram contadas as células viáveis nos quatro quadrantes externos da câmara. O número de células contadas foi igual a soma de células dos quatro quadrantes externos superiores e dos quatro inferiores dividido por dois. O número de células por mL foi obtido usando a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = (\text{n}^\circ \text{ células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4) \div 4$$

O total de células foi expressos em números de células tumorais/mL (Guerra, J.L., 1983).

4.7. Reprodução dos tumores nos animais

Os tumores sólidos foram obtidos por inoculação de $1,0 \times 10^6$ células e $2,5 \times 10^6$ células tumorais em 100 μL de salina, no tecido subcutâneo do animal, para os tumores de cólon e de Ehrlich sólido, respectivamente. Estes animais foram sacrificados após 25 dias.

O tumor ascítico de Ehrlich foi reproduzido pela inoculação de $2,5 \times 10^6$ células em 100 μL de salina na cavidade peritoneal do animal. No 8º dia os animais foram sacrificados.

4.8. Quantificação da angiogênese através da dosagem de hemoglobina (Hb)

A avaliação da angiogênese foi realizada, através de método colorimétrico, medindo-se o conteúdo de hemoglobina dos implantes, e dos tumores sólidos pelo método de Drabkin & Austin, 1935, adaptado para determinar o índice de neovascularização por Plunkett et al., 1990; Hu et al., 1995 e Teixeira et al., 1999. Neste método a hemoglobina reage com o reagente de Drabkin formando cianometahemoglobina. A absorvância final a 540nm é proporcional à concentração de hemoglobina. Assim, quanto maior for a vascularização, maior a quantidade de sangue no local e, por conseguinte maior a concentração de hemoglobina.

A dosagem de Hb foi realizada nos dias 7, 10 e 14 após o implante das esponjas e no 25^o dia posterior a inoculação de células tumorais. Os animais foram sacrificados, os implantes e os tumores retirados e pesados. Em seguida os tecidos foram homogenizados (Tekmar TR-10, Ohio; USA) em 2mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem de hemoglobina-Labtest; São Paulo/Brasil). O homogenato foi centrifugado por 15 min a 10.000 g, e o sobrenadante filtrado usando filtro 0.22µm (Millipore). A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura espectrofométrica a 540nm, usando leitor de microplacas de ELISA (SPECTRAMax PLUS, microplate spectrophotometer, Molecular Devices; Califórnia/USA) (FIG. 7). As leituras foram comparadas às de uma curva-padrão de hemoglobina (FIG. 8) previamente estabelecida. A concentração de hemoglobina foi expressa em µg Hb/mg de tecido.

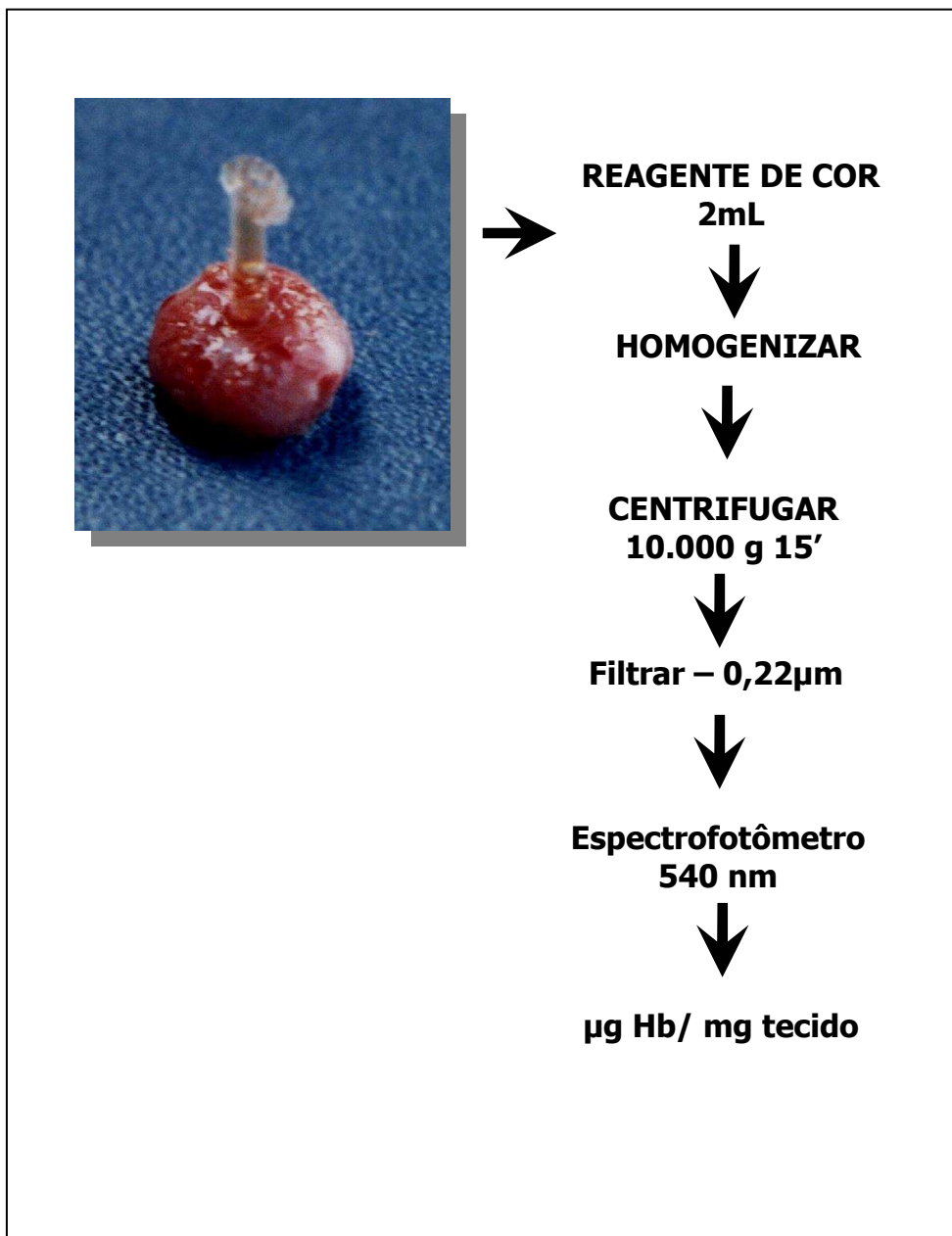


FIGURA 7 - ESQUEMA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA NO IMPLANTE DE ESPONJA.

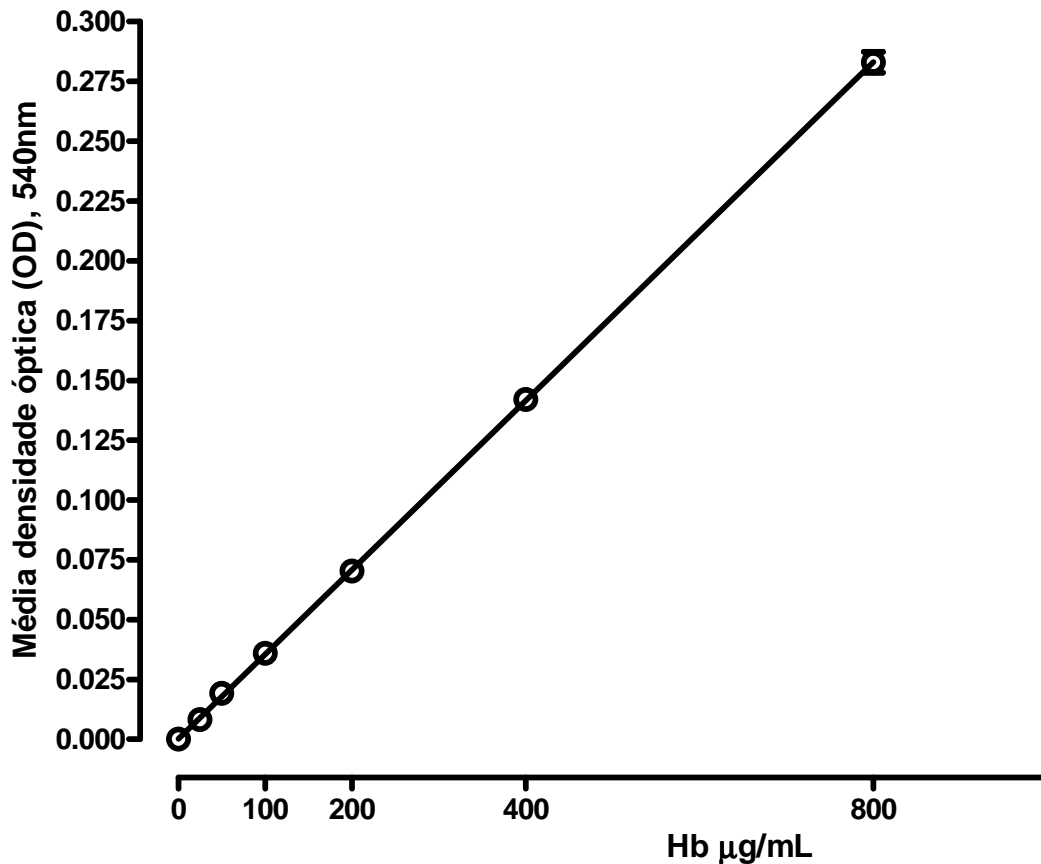


FIGURA 8 – CURVA PADRÃO DE HEMOGLOBINA (Hb). Representação de curva padrão da concentração de hemoglobina em µg/mL, utilizado para calcular a concentração desta substância nas amostras. $R^2 = 1$; $Y = mx + b$ ($m = 35,35 \times 10^{-5}$; $b = 26,20 \times 10^{-5}$)

4.9. Técnicas histológicas

Os implantes para avaliação histológica foram fixados em formalina tamponada⁸ durante 24 horas, posteriormente o material foi processado para inclusão em parafina e emblocado. Os blocos foram submetidos a microtomia (5 µm) e as lâminas montadas e coradas com Giemsa Lemmert para tecido.

⁸ Formalina tamponada: aldeído fórmico (37-40%) 100ml; fosfato monossódico 4g; fosfato bisódico 4,5g; água destilada 900ml.

4.10. Análise morfométrica da vascularização no implante de esponja

Para avaliar o grau de neovascularização nos implantes de camundongos controle (WT) e nocaute (PAFR-KO) um total de 18 esponjas (3 para cada intervalo de tempo de cada grupo) foram retiradas, fixadas em solução de formalina tamponada⁹ cortadas a 5 µm e coradas com Giemsa¹⁰. As imagens microscópicas dos cortes histológicos foram capturadas com uma objetiva (40X) plana apocromática em microscópio (Zeiss Axiolab; Zeiss; Germany). As imagens foram digitalizadas (câmara JVC/ TK-1270/JGB) e transferidas para o analisador de imagem (Kontron Eletronics, Carl Zeiss – KS300 versão 2).

Para a contagem, os vasos sangüíneos foram definidos como estruturas com luz e com presença ou não de hemácias. O número mínimo de campos microscópicos representativos por amostra, foi obtido pela contagem de vasos sangüíneos em 50 campos (aumento 400X, ou seja: objetiva 40X e ocular 10X; 0,053 mm² por campo) da lâmina escolhidos ao acaso em cada grupo como descrito por Moro et al., 2003. Com os dados destas 50 amostras foram criados, através de sorteio com reposição, grupos com 10, 15, 20, 30, 40 e 50 amostras. A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo. O número mínimo representativo de campos microscópicos por tratamento foi obtido quando o aumento no número de campos não resultou em considerável redução no respectivo valor do desvio padrão. Acima de 10 campos o desvio padrão não modificou assim, foram escolhidos 15 campos para a análise. Os resultados foram expressos em média ± e.p.m. do número total de vasos/campo. A área vascular foi calculada pela medida de cada vaso. A soma destas

⁹ Em formalina tamponada (Formaldeído a 37-40% 100ml; água destilada 900ml; fosfato de sódio monobásico 4g; fosfato de sódio dibásico (anidro) 6,5g) fixar durante 24 horas.

¹⁰ Giemsa Lemmert para tecido.

áreas foi então dividida pelo número de vasos para obter a média \pm e.p.m. da área vascular (μm^2).

4.11. Técnica para dosagem da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A peroxidase é uma enzima encontrada em leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Os eosinófilos, bem como os neutrófilos de diferentes espécies contém, grandes quantidades de peroxidase, entretanto a peroxidase de neutrófilo, mieloperoxidase (MPO), e a peroxidase de eosinófilo (EPO) diferem com relação à estrutura, a atividade bioquímica, imunologicamente, geneticamente e espectrofotometricamente uma da outra (Bos et al., 1981; Schneider & Issekutz, 1996). Os neutrófilos secretam três vezes mais MPO que os mononucleares (Krawisz et al., 1984).

A mieloperoxidase é importante como um agente bactericida catalizando a formação de hipoclorito a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e cloreto (Suzuki et al., 1983; Sorensen et al., 1999). Esta enzima é encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e, tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento destas células no pulmão e no miocárdio isquêmico (Cross, et al., 2003; Mullane, et al., 1985;). A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação. É uma técnica que possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Cross, et al., 2003; Mullane, et al., 1985;).

Após o processamento dos implantes e dos tumores sólidos, para a determinação da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de tampão salino EDTA-fosfato de sódio-

HCl, pH 4,7¹¹, homogenizado (vortex) e, centrifugado a 12.000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado em 2,0 ml de tampão fosfato de sódio¹² 0,05M, pH 5,4, contendo 0,5% de HTAB (Brometo de Hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio - Sigma), detergente iônico importante para solubilizar a MPO facilitando sua extração. A suspensão foi congelada e descongelada três vezes usando nitrogênio líquido e finalmente, centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C. A atividade da MPO foi medida no sobrenadante em ensaio enzimático.

O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Os procedimentos seguiram a adição de 25 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - Sigma) na concentração final de 1,6 mM, diluído em DMSO (dimetil sulfoxido - Merck); adição de 100 µl de H₂O₂ na concentração final de 0,003% v/v dissolvida em tampão fosfato de sódio pH 5,4; adição de 25 µL do sobrenadante das amostras processadas; em seguida foi incubado a 37°C por 5 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 4M a 4°C. A absorbância das amostras foi medida a 450 nm em espectrofotômetro¹³. Os resultados foram expressos em OD (densidade óptica) por g de tecido (FIG. 9).

¹¹Tampão salino EDTA-fosfato de sódio-HCl: NaCl 0,1M; Na₃PO₄ 0,02M; Na₂EDTA 0,015M. Acertar o pH com HCl.

¹² Tampão fosfato de sódio a 0,05M pH 5,4: 196ml NaH₂PO₄ a 0,2M; 4ml Na₂HPO₄ a 0,2M; 600ml H₂O destilada.

¹³ SPECTRAMax PLUS, microplate spectrophotometer, Molucular Devices; Califórnia/USA

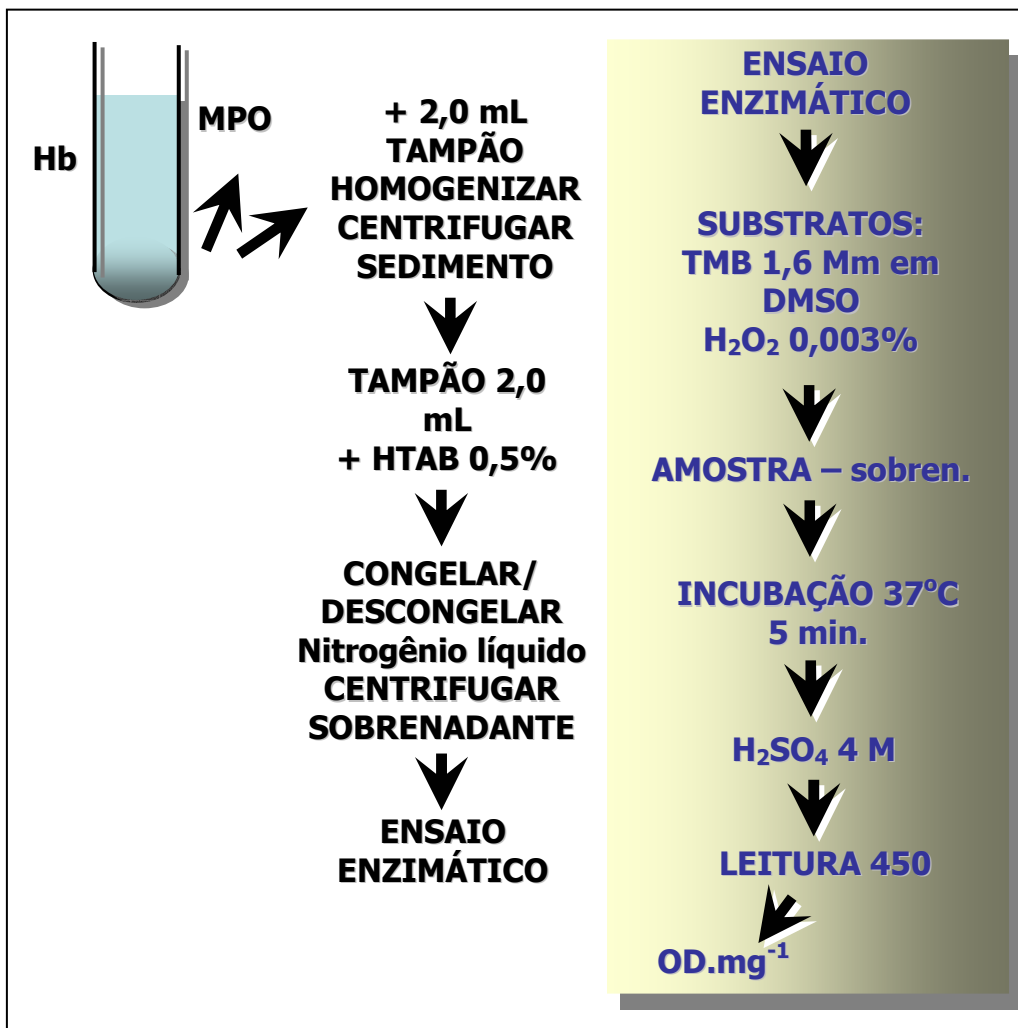


FIGURA 9 – ESQUEMA DA DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).

O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Os procedimentos seguiram a adição de 25 μL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – Sigma) na concentração final de 1,6 mM, diluído em DMSO (dimetil sulfóxido - Merck); adição de 100 μL de H_2O_2 na concentração final de 0,003% v/v dissolvida em tampão fosfato de sódio pH 5,4; adição de 25 μL do sobrenadante das amostras processadas; em seguida foi incubado a 37°C por 5 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 100 μL de ácido sulfúrico 4M a 4°C. A absorbância das amostras foi medida a 450 nm

em espectrofotômetro¹⁴. Os resultados foram expressos em OD (densidade óptica) por g de tecido (FIG. 9).

4.12. Técnica para dosagem de atividade de *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 *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glicosamina (substrato) pela *N*-acetil- β -D-glicosaminidase liberando *p*-nitrofenol.

O ensaio foi feito usando uma parte do sedimento obtido na dosagem de hemoglobina que, foi pesado e congelado a -20°C por no máximo 15 dias.

A dosagem do NAG iniciou com o descongelamento do sedimento; adição de solução de NaCl (0,9% w/v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega); homogenização por 30 segundos e, centrifugação a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (100 μ L) foi utilizado para a realização do ensaio. Foram adicionadas à placa de microtitulação de 96 poços 100 μ L das amostras; 100 μ L de substrato (*p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glicosamina - Sigma) 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio¹⁵ 0,1M pH 4,5. Após uma incubação a 37°C durante 10 minutos, foi adicionado 100 μ L de tampão glicina¹⁶ 0,2 M pH 10,6 para paralisar a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa (405 nm). Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por g de tecido (FIG. 10).

¹⁴ SPECTRAMax PLUS, microplate spectrophotometer, Molecular Devices; Califórnia/USA

¹⁵ Tampão citrato-fosfato de sódio: 200ml de ácido cítrico 0,1M; 310ml de fosfato de sódio monoácido 0,1M.

¹⁶ Tampão glicina: misturar volumes iguais de glicina 0,8M; NaCl 0,8M; NaOH 0,8M.

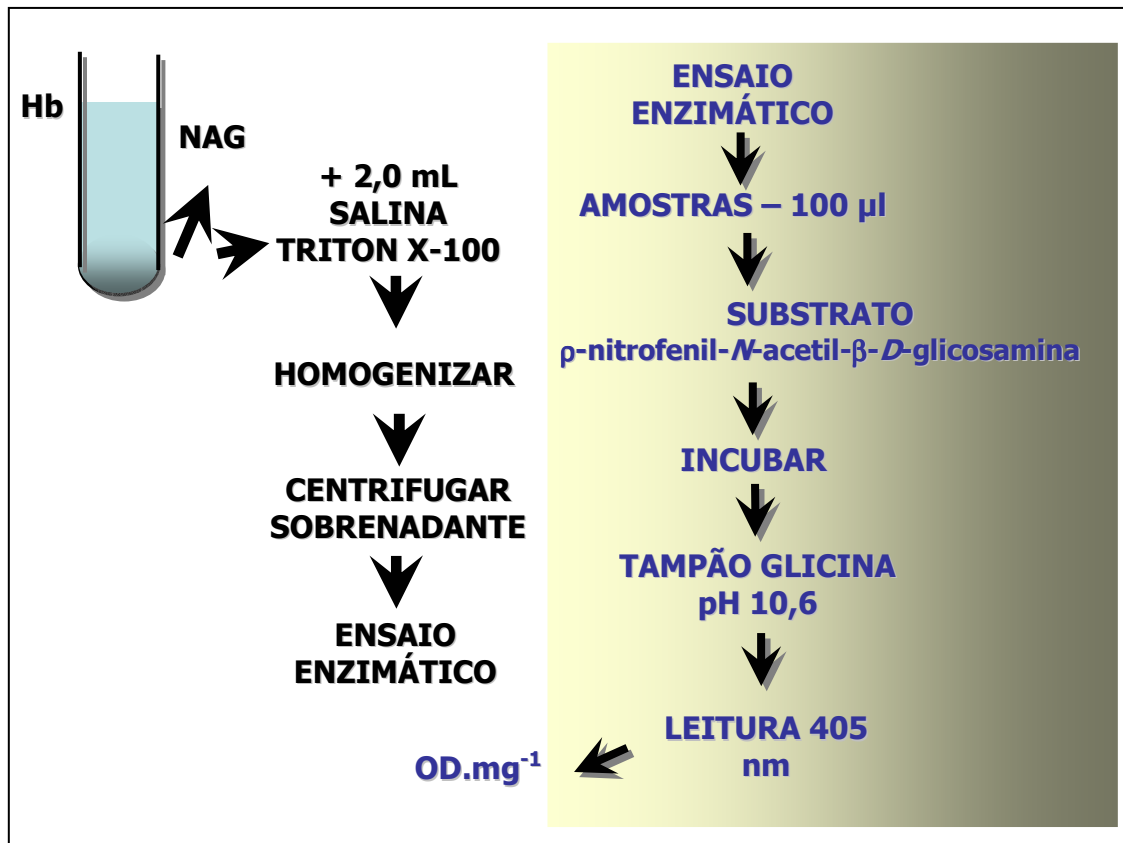


FIGURA 10 - ESQUEMA DA DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA *N*-ACETIL-β-*D*-GLICOSAMINIDASE (NAG).

4.13. Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF, TNF-α, CXCL2 (KC) e CCL2 (MCP-1/JE)

As amostras dos implantes e dos tumores (100 µL do sobrenadante da dosagem de hemoglobina) foram homogenizadas em 500 µL de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween-20 (Difco), centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi reservado. As citocinas, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e as quimiocinas,

proteína derivada de queratinócitos (CXCL2(KC)) e proteína 1 quimiotática de monócitos (CCL2(MCP-1/JE)) foram dosadas em 50 μ L do sobrenadante usando kits de imunoensaio (R & D Systems, USA) e seguindo seus protocolos. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 100 μ L/poço de anticorpo primário (polyclonal anti-camundongo) específico para a citocina/quimiocina a ser avaliada e incubada a 4°C *overnight*. Foram feitas quatro lavagens com 400 μ L de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Foram então adicionados à placa 200 μ L/poço de PBS pH 7,4 com 1% de BSA (albumina de soro bovino) (tampão de bloqueio) e incubado durante 1 hora, para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. A placa foi novamente lavada com tampão de lavagem. Os padrões e as amostras diluídas em PBS pH 7,4 com 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 (100 μ L/poço) foram adicionados à placa e incubados a 4°C *overnight*. A placa foi lavada, 100 μ L/poço do apropriado anticorpo de detecção biotilado foi adicionados e incubado por 2 horas. A placa foi lavada, 100 μ L/poço do conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa, 100 μ L/poço de OPD (θ -phenilenodiamine – Sigma) diluído em tampão citrato a 0,03M pH 5,0 contendo 0,02% de H₂O₂ 30 v/v foi adicionado. A placa foi incubada abrigada da luz durante 30 minutos. A reação foi interrompida por adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ 1M. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 492nm (FIG. 11). Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata e as incubações (exceto as *overnight*) foram à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em μ g/mg de tecido e/ou μ g/mL. Uma curva-padrão, com sete pontos, foi construída usando, diluições seriadas (da citocina/quimiocina padrão) a partir de 1000 μ g/mL. O gráfico obtido foi linearizado e a melhor reta de ajuste foi obtida por análise de regressão (FIG. 12a e b; FIG. 13 a e b).

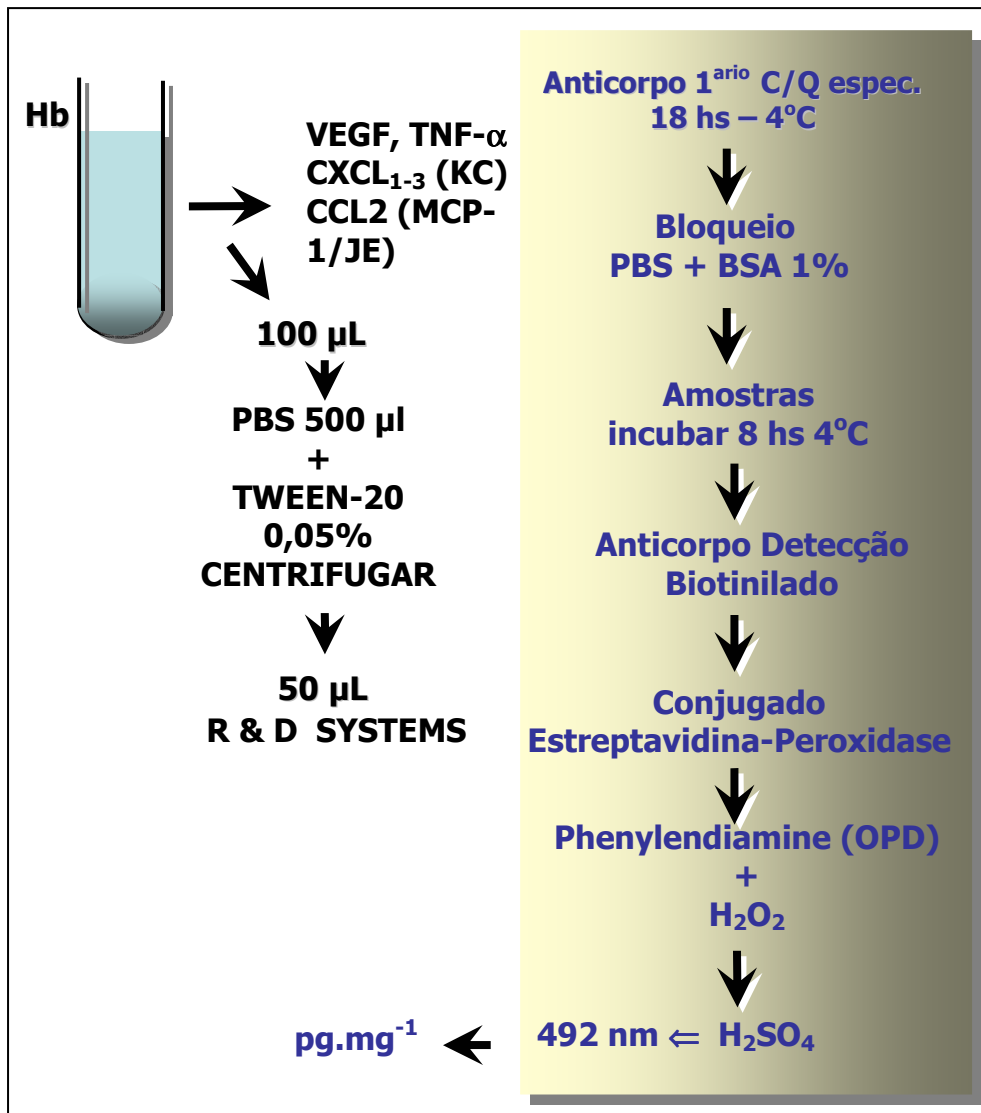


FIGURA 11 - ESQUEMA DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DOSAGEM DE VEGF, TNF- α , CXCL2(KC) e CCL2(MCP-1/JE).

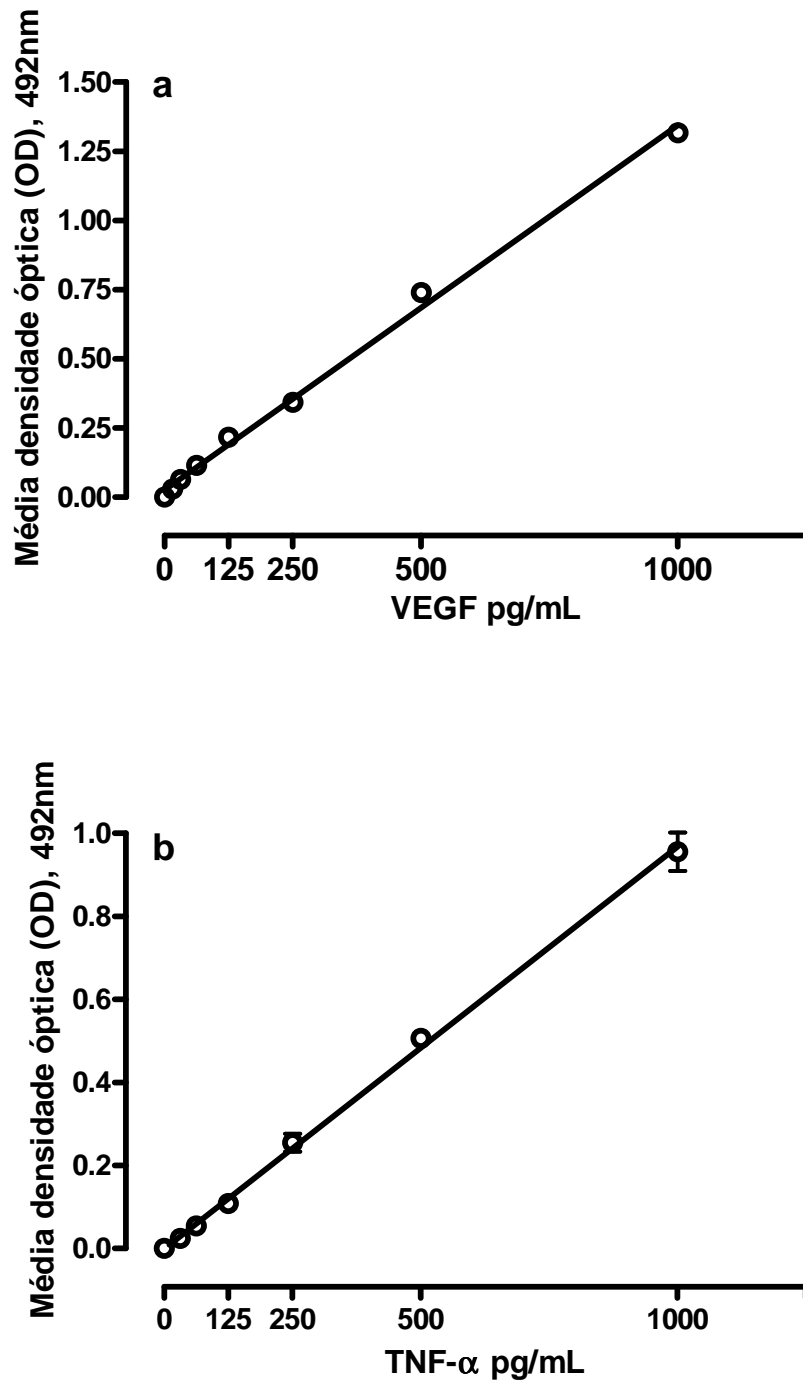


FIGURA 12 - CURVAS PADRÃO DAS CITOCINAS VEGF E TNF- α . Representa a curva padrão das concentrações em pg/mL do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (a) e fator de necrose tumoral alfa, TNF- α (b), utilizadas para calcular a concentração destas substâncias nas amostras. $y = mx + b$. VEGF ($m = 13,18 \times 10^{-4}$; $b = 2,61 \times 10^{-2}$; $R^2 = 0,9962$); TNF- α ($m = 96,88 \times 10^{-5}$; $b = -57,03 \times 10^{-5}$; $R^2 = 0,9986$).

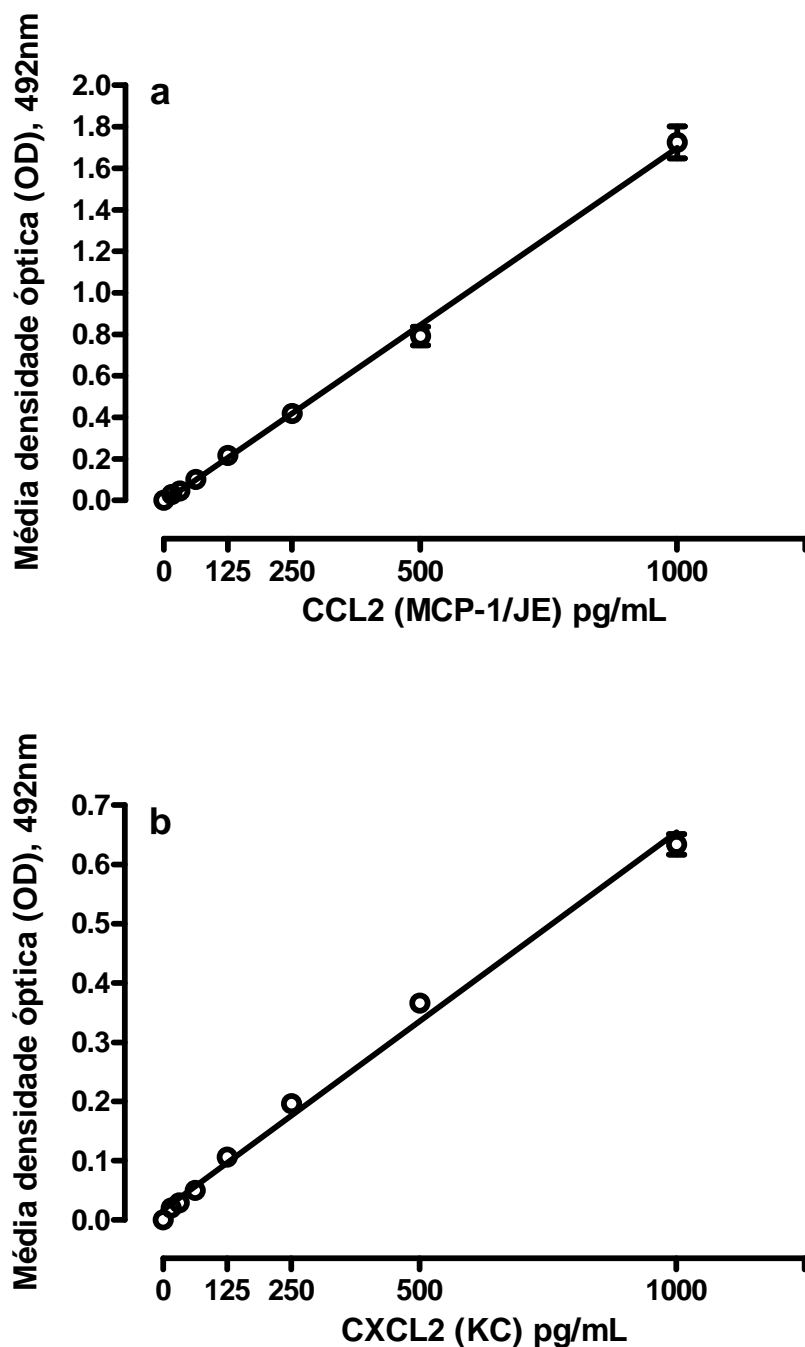


FIGURA 13 – CURVAS PADRÃO DE CCL2(MCP-1/JE) E CXCL2(KC).

Concentrações em pg/mL de CCL2(MCP-1/JE), proteína quimiotática de monócitos 1 (a) e CXCL2(KC), quimiocina derivada de queratinócito (b), utilizadas no cálculo da concentração destas substâncias nas amostras. $y = mx + b$. CCL2(MCP-1/JE) ($m = 17,06 \times 10^{-4}$; $b = -74,77 \times 10^{-4}$; $R^2 = 0,9984$) e CXCL2(KC) ($m = 63,73 \times 10^{-5}$; $b = 17,12 \times 10^{-3}$; $R^2 = 0,9935$).

4.14. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm e.p.m. (erro padrão da média). Todos os dados analisados foram submetidos ao teste de normalidade¹⁷ usando o teste Kolmogorov-Smirnov¹⁸. A comparação entre dois grupos foi realizada através do teste *t de Student* para dados não pareados ou pelo teste de Mann-Whitney. Quando três ou mais grupos foram comparados foi usado a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-keuls para verificar a diferença entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$. O programa de estatística usado foi o GraphPad Prism 3.0.

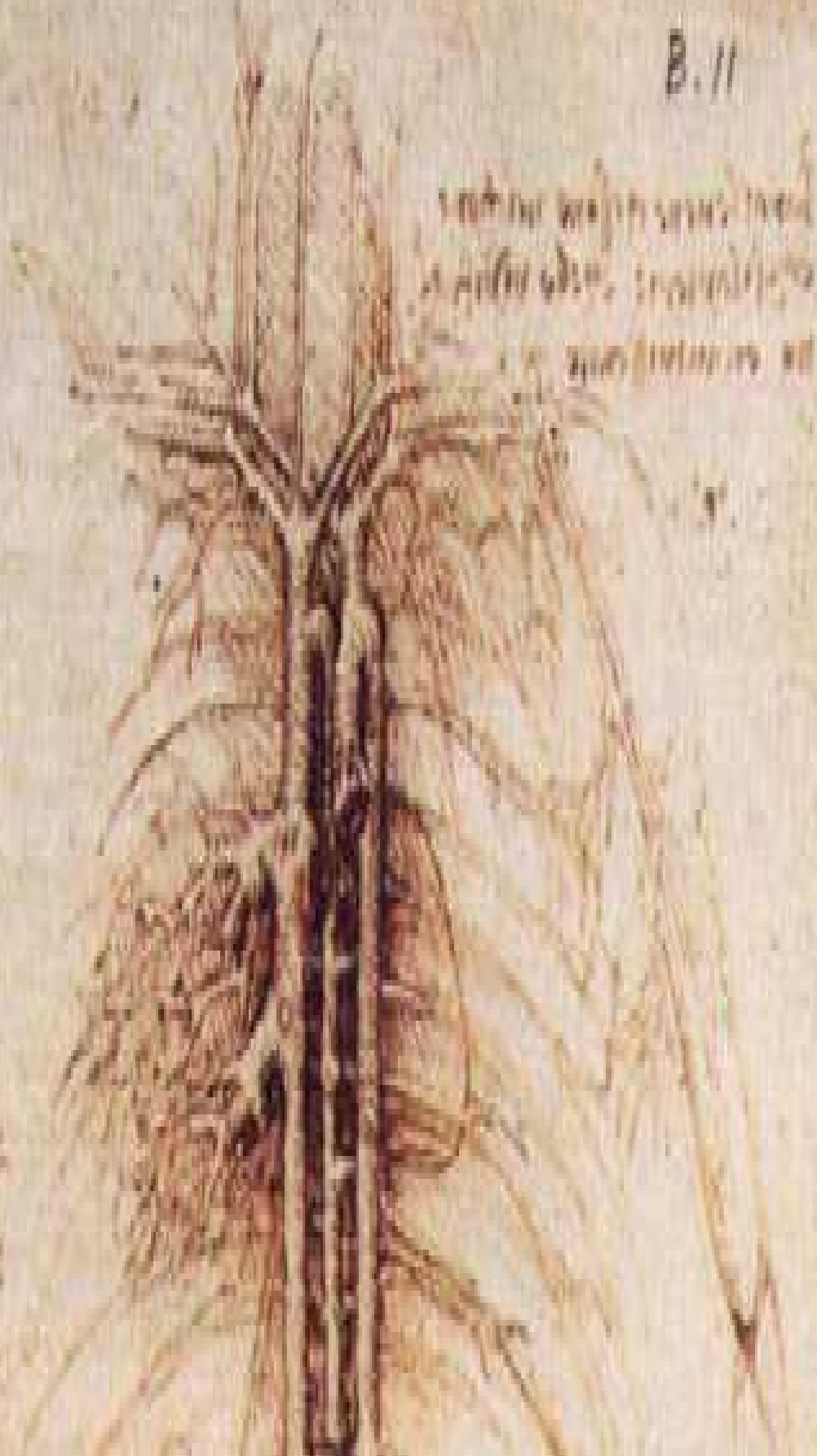
¹⁷ A distribuição Gaussiana é também chamada de distribuição normal, o teste é chamado de teste de normalidade.

¹⁸ O teste Kolmogorov-Smirnov quantifica a discrepância entre a distribuição dos dados e o ideal de distribuição Gaussiana – grandes valores demonstram grandes discrepâncias.

B.11

Handwritten notes in a non-Latin script, possibly Indic, located on the left side of the page.

Handwritten notes in a non-Latin script, possibly Indic, located in the upper right quadrant.



Resultados

Handwritten notes in a non-Latin script, possibly Indic, located at the bottom left corner.

Handwritten notes in a non-Latin script, possibly Indic, located at the bottom right corner.

5. Resultados

5.1. REATIVIDADE VASCULAR

5.1.1 Resposta da rede vascular cutânea ao PAF em camundongos PAFR-KO e WT

A resposta da rede vascular cutânea após administração aguda de 1µg de PAF nos camundongos PAFR-KO foi avaliada e comparada com a resposta observada nos animais WT (FIG. 14). A mesma dose do mediador aplicada na rede vascular cutânea de camundongos WT causou um aumento significativo ($P < 0,05$; $n=5$) no valor de $T_{1/2}$ do pico de fluorescência quando comparado com o valor médio do veículo injetado. Em contraste, administração de PAF exógeno na pele de camundongos PAFR-KO não produziu aumento do valor de $T_{1/2}$. Esta ausência de resposta vasoconstritora para o PAF confirmou a perda do receptor nestes animais.

5.2. AVALIAÇÃO DOS IMPLANTES DE ESPONJA

5.2.1. Avaliação da angiogênese induzida pelo implante em camundongo WT e PAFR-KO

A matriz esponjosa foi bem tolerada pelos animais. Nenhum sinal de infecção ou rejeição foi observado durante os 14 dias de duração do experimento.

O conteúdo de hemoglobina (Hb), uma estimativa da neovascularização, aumentou gradativamente em ambos os grupos, mas foi significativamente maior nos camundongos PAFR-KO em todos os intervalos de tempo estudados (FIG. 15). Nos implantes de

WT, os valores de Hb ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ peso úmido) aumentaram de $0,98 \pm 0,19$; $n=6$ no 7º dia, para $2,78 \pm 0,19$; $n=7$ no 14º dia após o implante, quase três vezes durante o período. No mesmo intervalo de tempo, os níveis de Hb no grupo PAFR-KO iniciaram num nível mais alto no 7º dia ($1,88 \pm 0,53$; $n=5$) e, aumentaram quase na mesma proporção (três vezes) no 14º dia ($5,23 \pm 0,31$; $n=5$).

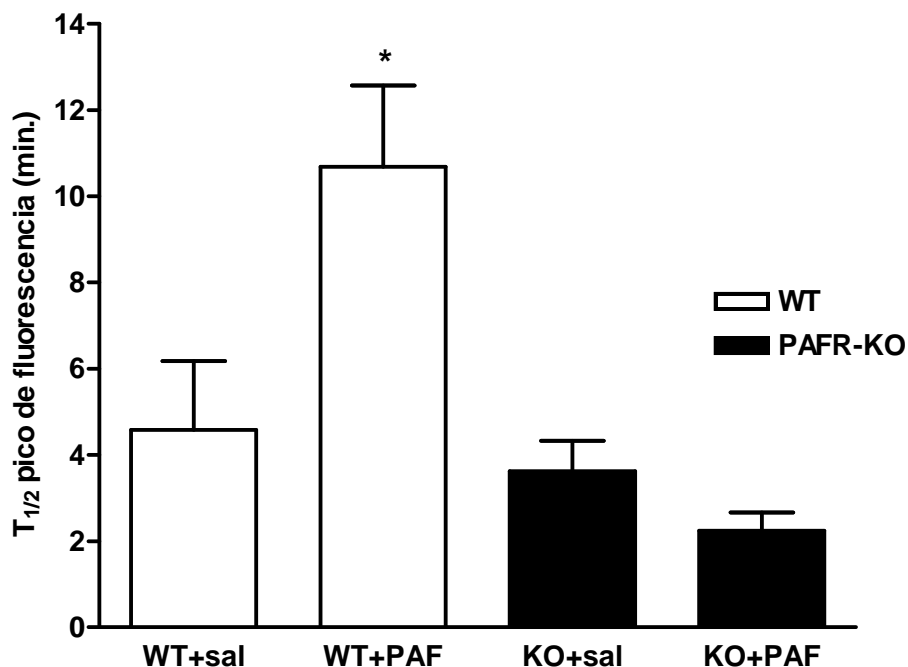


FIGURA 14 – AUSÊNCIA DE RESPOSTA VASOCONSTRITORA PARA O PAF NA PELE DE CAMUNDONGOS PAFR-KO. A aplicação local de PAF ($1\mu\text{g}$) na pele de camundongos WT produziu aumento no valor de $t_{1/2}$ do pico de fluorescência. O mediador não causou alteração no valor de $t_{1/2}$ quando aplicado na pele dos animais PAFR-KO. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m de 3 a 4 animais por grupo. * $P < 0,05$.

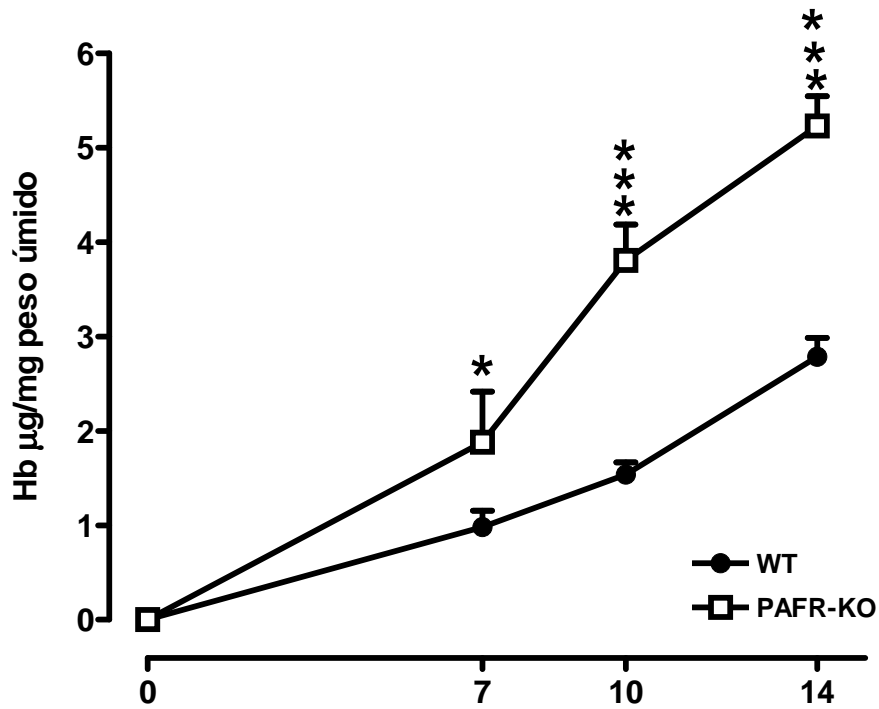


FIGURA 15 – PERFIL DA ANGIOGÊNESE NOS IMPLANTE DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. A angiogênese foi avaliada através da concentração de hemoglobina (Hb) nos implantes, a qual mostrou-se marcadamente aumentada nos implantes dos animais PAFR-KO. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m.; $n=8$. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

5.2.2. Avaliação histológica da angiogênese

Os implantes de ambos os grupos, após coloração com Giemsa mostraram crescimento de tecido fibrovascular nos três intervalos de tempo estudados (7, 10 e 14 dias após o implante de esponja). As modificações histológicas ocorridas durante o desenvolvimento do tecido de granulação, induzido pelo implante de esponja, foram ilustradas na FIG. 16 (7º dia (a); 14º dia (b)). No 7º dia, o tecido fibrovascular (tecido de granulação) dos implantes de camundongos WT e PAFR-KO era constituído de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e capilares em meio a matriz extracelular. No 14º dia, o estroma era constituído de fibras colágenas mais maduras, densamente preenchidas com fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos neoformados contendo hemácias indicando sua funcionalidade. Comparando a histologia dos implantes dos grupos PAFR-KO e WT, o primeiro mostrou menor recrutamento de células inflamatórias e um maior número de vasos sanguíneos congestos em todos os intervalos de tempo testados (FIG. 16).

A análise morfométrica da vascularização dos implantes mostrou que nos camundongos WT, em qualquer intervalo de tempo, o número de vasos era menor que nos implantes do grupo PAFR-KO. Nos dois grupos o número de vasos aumentou rapidamente (7º dia), mas permaneceu estável após o 10º dia (TABELA 1).

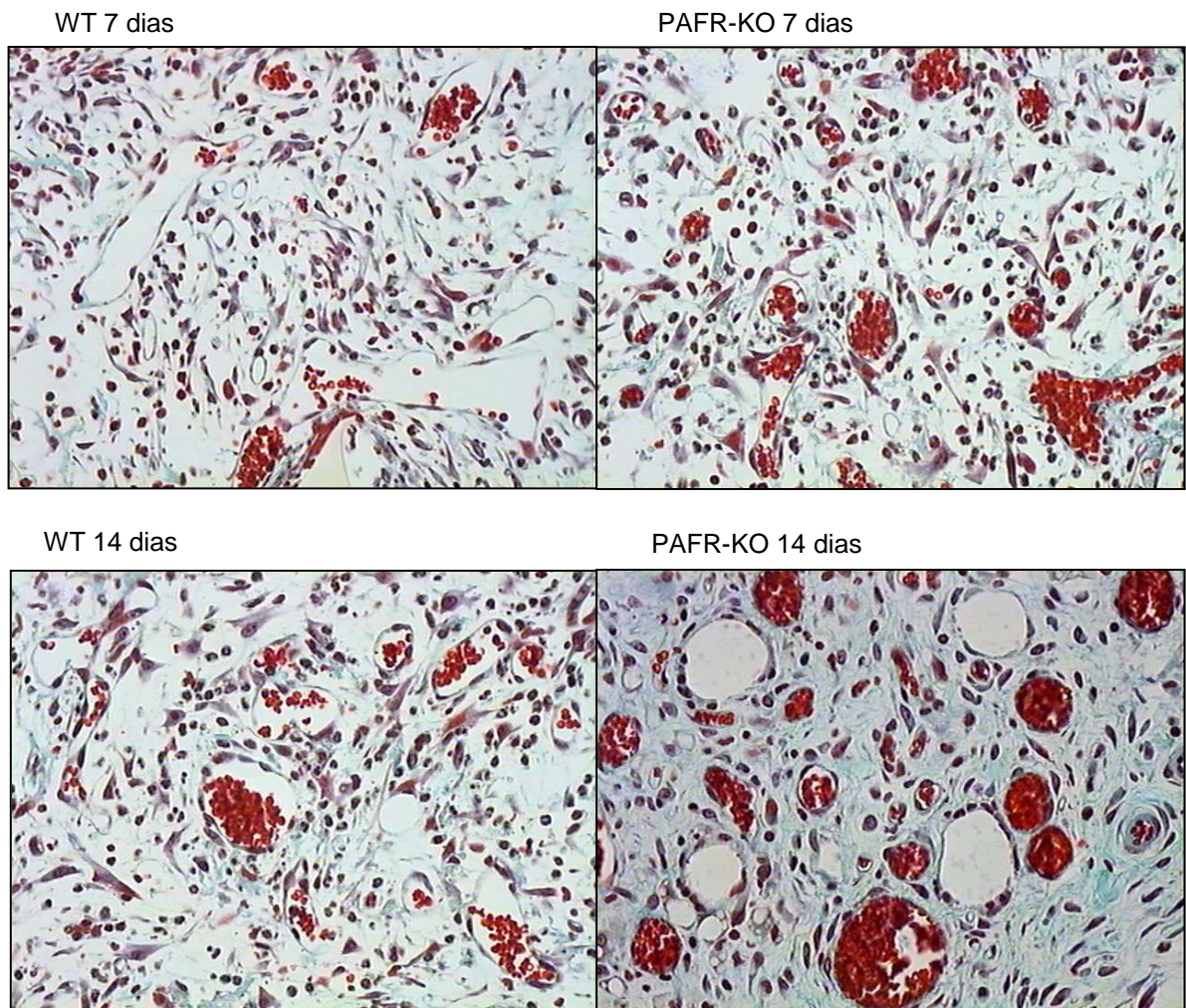


FIGURA 16 – CORTES HISTOLÓGICOS DE IMPLANTES DE ESPONJAS DE CAMUNDONGO WT E PAFR-KO (7 E 14 DIAS) CORADOS COM GIEMSA. O estroma fibrovascular, com 7 dias nos dois grupos, é composto de vasos sanguíneos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos em meio ao tecido conjuntivo frouxo da matriz extracelular. O número de vasos está aumentado no grupo PAFR-KO. No 14º dia, os implantes de ambos os grupos são constituídos de fibras colágenas mais maduras densamente cheias de fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos neoformados contendo hemácias, indicativo de sua funcionalidade. A histologia dos implantes de PAFR-KO exibe elevado número de vasos congestionados quando comparado com os implantes de WT. Aumento 66X; M= matriz esponjosa.

TABELA 1**Quantificação da angiogênese através de análise morfológica**

Dias após implante	Número de vasos / campo		Área vascular (μm^2)	
	WT	PAFR-KO	WT	PAFR-KO
7	17 \pm 2	25 \pm 2*	330 \pm 19	400 \pm 23*
10	17 \pm 1	22 \pm 2*	453 \pm 28	567 \pm 34*
14	16 \pm 1	21 \pm 1*	458 \pm 33	609 \pm 63*

Os dados representam a média \pm e.p.m. O número de vasos foi obtido pela contagem de 45 campos (três repetições de 15 campos) das esponjas implantadas nos camundongos WT e PAFR-KO. A área vascular é a soma da área do lume dos vasos dividida pelo número de vasos. *P < 0,05, diferença significativa entre os valores observados nos camundongos PAFR-KO e WT.

5.2.3. Avaliação do efeito do UK 74505, na angiogênese induzida pelo implante de esponja

Similarmente aos achados observados nos implantes de camundongos PAFR-KO, o tratamento com o antagonista do PAF aumentou a angiogênese. O conteúdo de hemoglobina dos implantes com 7 dias do grupo tratamento com UK 74505 foi $2,2 \pm 0,7$; n=5 comparado com o grupo controle tratado com o veículo $0,84 \pm 0,08$; n=7 (FIG. 17).

5.2.4. Avaliação do VEGF e TNF- α - citocinas envolvidas na angiogênese

Os níveis de citocinas pro-angiogênicas, VEGF e TNF- α (FIG. 18a e b) foram medidos nos implantes dos dois grupos de camundongos. Os valores destas dosagens não diferem entre os

grupos e exibiram um perfil bifásico similar; ou seja, houve um aumento inicial no 7^o dia seguido por uma queda marcante no 14^o dia. O VEGF foi significativamente diferente entre os dois grupos no 10^o dia.

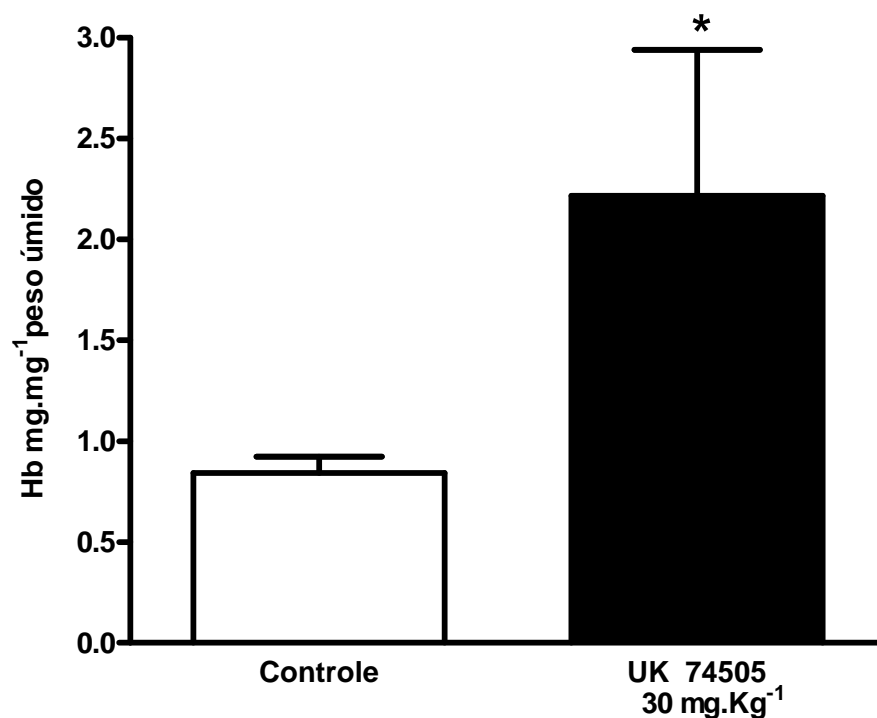


FIGURA 17 – EFEITO DO ANTAGONISTA DO PAF, UK 74505, NA ANGIOGÊNESE DOS IMPLANTES DE ESPONJA COM 7 DIAS. A angiogênese foi avaliada através do conteúdo de Hb nos implantes, o qual mostrou-se marcadamente aumentado nos implantes dos animais tratados com o antagonista do PAF. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m de 5 animais de cada grupo. * $P < 0,05$.

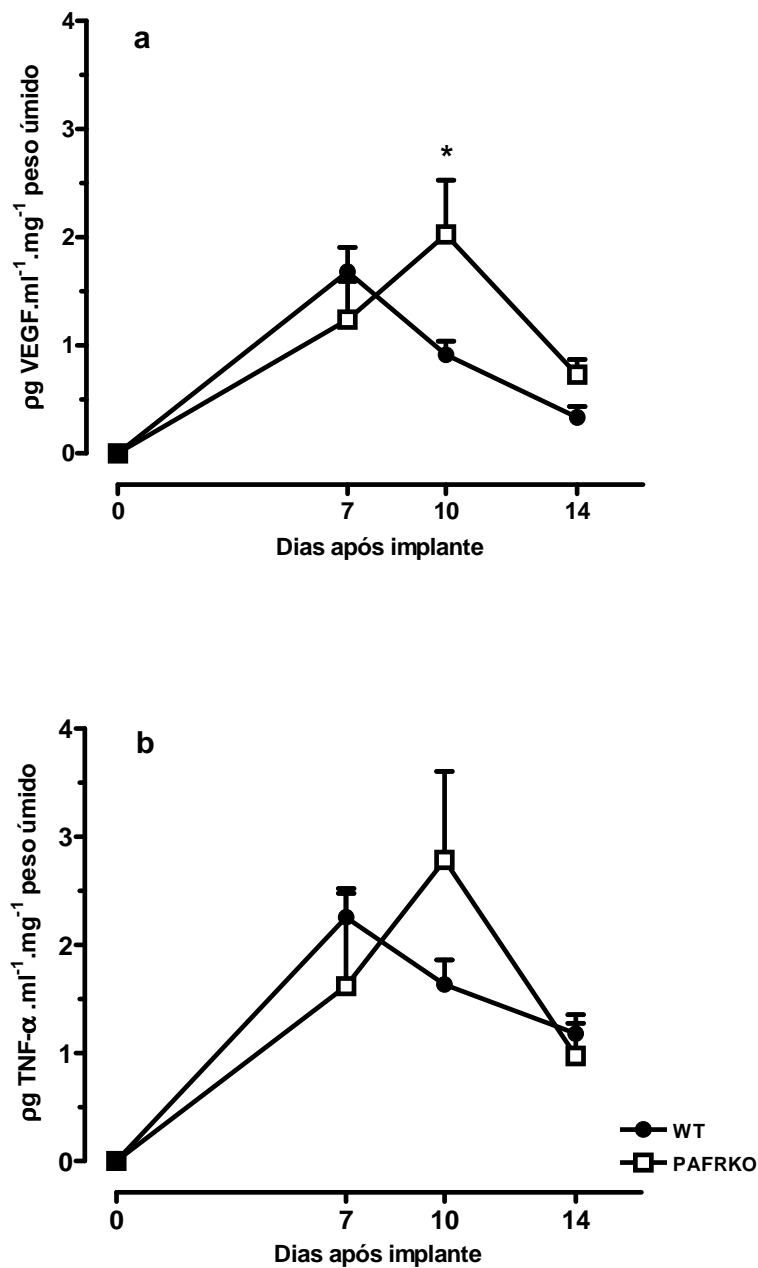


FIGURA 18 – AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRO-ANGIOGÊNICAS E SUA PRODUÇÃO NOS IMPLANTES DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. Os níveis de VEGF (a) e TNF- α (b) foram similares em ambos os grupos. O VEGF foi significativamente mais alto nos animais PAFR-KO no 10^o dia após o implante. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de 8 animais em cada grupo. * $P < 0,05$.

5.2.5. Cinéticas da inflamação e de quimiocinas induzidas pelo implante de esponja em camundongos WT e PAFR-KO

Os acúmulos de neutrófilos e macrófagos foram avaliados pelas medidas das atividades da mieloperoxidase (MPO) e da *N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (NAG), um indicador indireto do número de neutrófilos e de macrófagos respectivamente. Como mostra a FIG. 19a e b, os níveis das atividades destas enzimas foram marcadamente mais baixos nos implantes de camundongos PAFR-KO quando, comparados com os dos animais WT. Este efeito foi mais proeminente sobre os neutrófilos. Estes dados confirmam o papel do PAF no recrutamento de células inflamatórias.

Para investigar a influencia do PAF na produção de quimiocina¹⁹ CXCL2 (KC) e de CCL2 (MCP-1 / JE), mediadores do recrutamento de células inflamatórias, os níveis destas moléculas foram medidos nos implantes (FIG. 19c e d). Os níveis de CXCL2 (KC) e CCL2(MCP-1 / JE) alcançaram o máximo no 10º dia no grupo PAFR-KO e no WT no 7º dia, depois caíram progressivamente.

Interessantemente, os níveis destas quimiocinas foram significativamente mais altos nos implantes dos camundongos PAFR-KO quando, comparados com os do grupo controle WT.

¹⁹ Família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração leucocitária do sangue para os tecidos (Abbas et al, 2003).

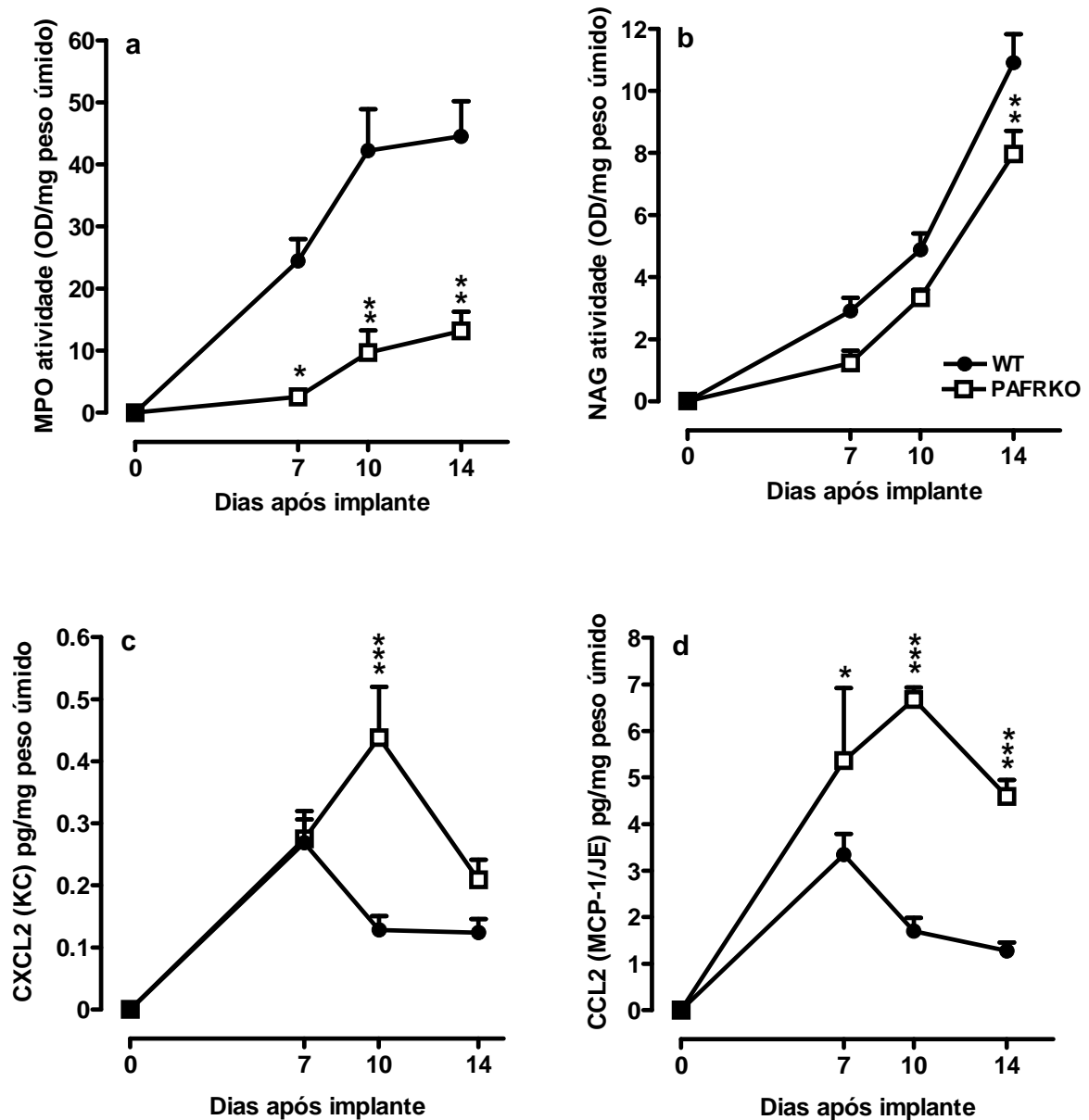


FIGURA 19 - CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS NO IMPLANTE DE ESPONJA EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. Neutrófilos (a) e macrófagos (b) recrutados no implante foram medidos através da atividade de MPO e NAG, respectivamente. Nos implantes dos animais PAFR-KO, os níveis MPO e NAG foram marcadamente baixos em comparação com os animais WT. Inversamente, os níveis de CXCL2(KC) e CCL2(MCP1/JE) foram altos nos implantes dos camundongos PAFR-KO (c e d). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de 8 animais em cada grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO VASCULAR, DA INFLAMAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS TUMORES DE CÓLON E EHRlich

5.3.1. Crescimento tumoral, em camundongos WT e PAFR-KO

A inoculação das células dos tumores de cólon e Ehrlich induziram o crescimento da massa tumoral em todos os animais. Durante o período do experimento não houve perdas, não foi observado caquexia e os animais movimentavam-se sem dificuldade. O crescimento tumoral avaliado através do peso (mg) mostrou que para o tumor de cólon não houve diferença de crescimento nos dois grupos WT e PAFR-KO (FIG. 20a) entretanto, o tumor de Ehrlich teve um desenvolvimento significativamente maior nos nocautes (FIG. 20b).

5.3.2. Avaliação da angiogênese nos tumores em camundongos WT e PAFR-KO

A avaliação da angiogênese nos tumores do cólon e de Ehrlich foi feita através da dosagem de hemoglobina (Hb). Os resultados mostraram um aumento da concentração de hemoglobina para o tumor de cólon no grupo PAFR-KO indicando uma maior vascularização do tumor neste grupo (FIG. 21a). O tumor de Ehrlich não mostrou diferença significativa na concentração de Hb nos grupos WT e PAFR-KO (FIG. 20b) apesar de seu maior crescimento no grupo PAFR-KO (FIG. 19b).

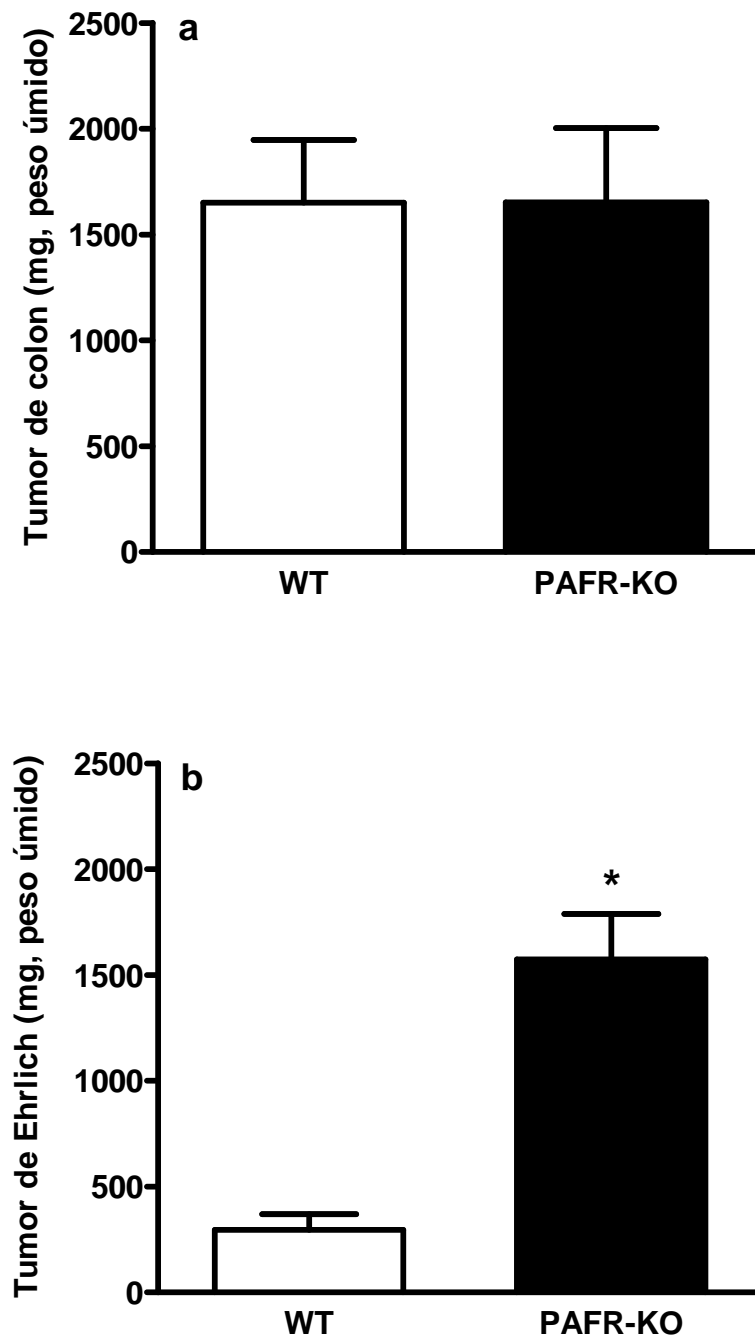


FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR DE CÓLON E DE EHRlich EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. O tumor do cólon mostrou crescimento semelhante nos dois grupos WT e PAFR-KO (a). No grupo PAFR-KO o tumor de Ehrlich sólido apresentou um aumento no crescimento (b). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais em cada grupo. * $P < 0.05$.

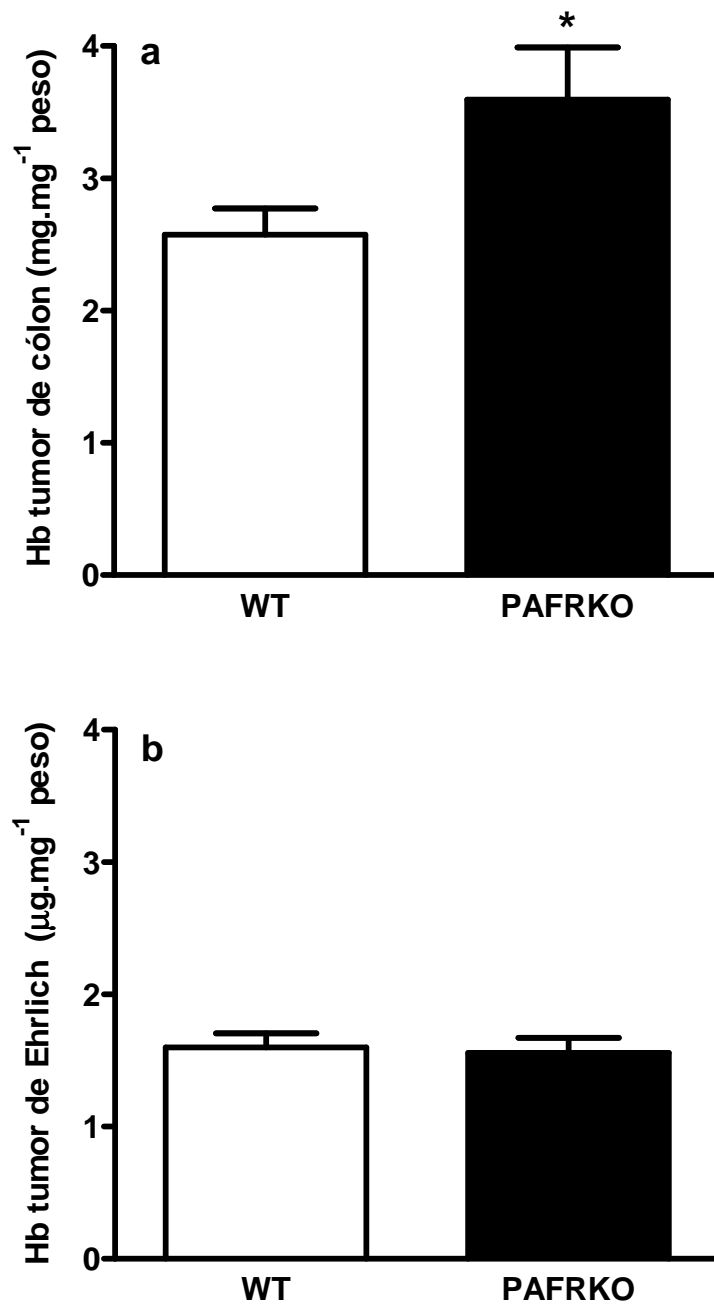


FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NOS TUMORES SÓLIDOS DE CÓLON E DE EHRlich EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. O tumor de cólon apresentou maior concentração de hemoglobina no grupo PAFR-KO indicando maior índice de vascularização (a). A concentração de hemoglobina no tumor de Ehrlich foi a mesma nos dois grupos (b). Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. de 10 animais em cada grupo. * $P < 0,05$.

5.3.3. Avaliação de citocinas pro-angiogênicas nos tumores em camundongos WT e PAFR-KO

Os níveis das citocinas VEGF e TNF- α , foram medidos nos tumores de cólon e de Ehrlich nos grupos WT e PAFR-KO (FIG. 22). Os resultados mostram um significativo aumento do VEGF nos dois tumores no grupo PAFR-KO (FIG. 22a e b). Os níveis de TNF- α , estavam aumentados no tumor de cólon nos animais PAFR-KO (FIG. 22c) e, não apresentaram diferenças significativa no tumor sólido de Ehrlich (FIG. 22d) nos dois grupos.

5.3.4. Avaliação da inflamação e de quimiocinas induzida pelo crescimento tumoral em camundongos WT e PAFR-KO

O acúmulo de neutrófilos foi avaliado pela medida de atividade da mieloperoxidase (MPO). Como mostra a FIG. 23a e b os níveis de atividade desta enzima foram marcadamente baixos nos tumores de cólon e de Ehrlich do grupo PAFR-KO em comparação com os WT. Nos dois tumores o grupo PAFR-KO mostrou um menor acúmulo de neutrófilos em relação ao WT. Para determinar a influência do PAF sobre a produção de quimiocinas, mediadores do recrutamento de células inflamatórias, os níveis de CXCL2 (KC) (FIG. 23 c e d) e CCL2 (MCP-1/JE) (FIG. 24d e e) foram medidos nos tumores nos grupos WT e PAFR-KO. Os níveis de CXCL2(KC) foram semelhantes no tumor de cólon nos animais WT e PAFR-KO (FIG. 23c). No tumor de Ehrlich os níveis de CXCL₂(KC) foram menores nos animais PAFR-KO (FIG. 23d). No tumor de Ehrlich o MPO e CXCL2(KC) tiveram um perfil semelhante.

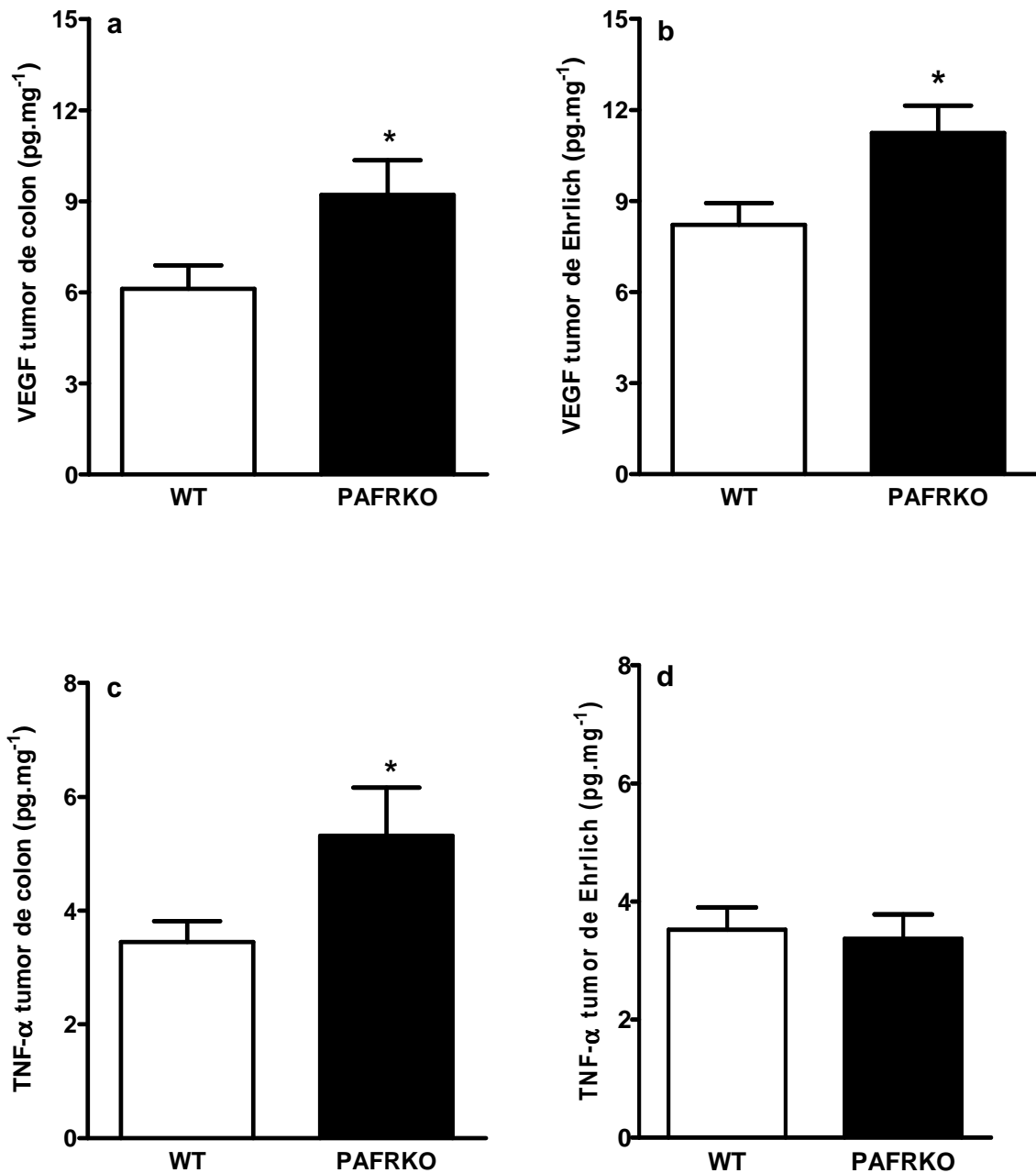


FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DE VEGF E TNF- α NOS TUMORES DE CÓLON E DE EHRlich EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. Os níveis de VEGF foram maiores nos tumores de cólon e de Ehrlich no grupo PAFR-KO (a e b). Os níveis de TNF- α no tumor de cólon foram maiores no grupo PAFR-KO (c). O tumor de Ehrlich não apresentou diferença significativa no TNF- α entre os dois grupos. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. de 10 animais em cada grupo. * $P < 0,05$.

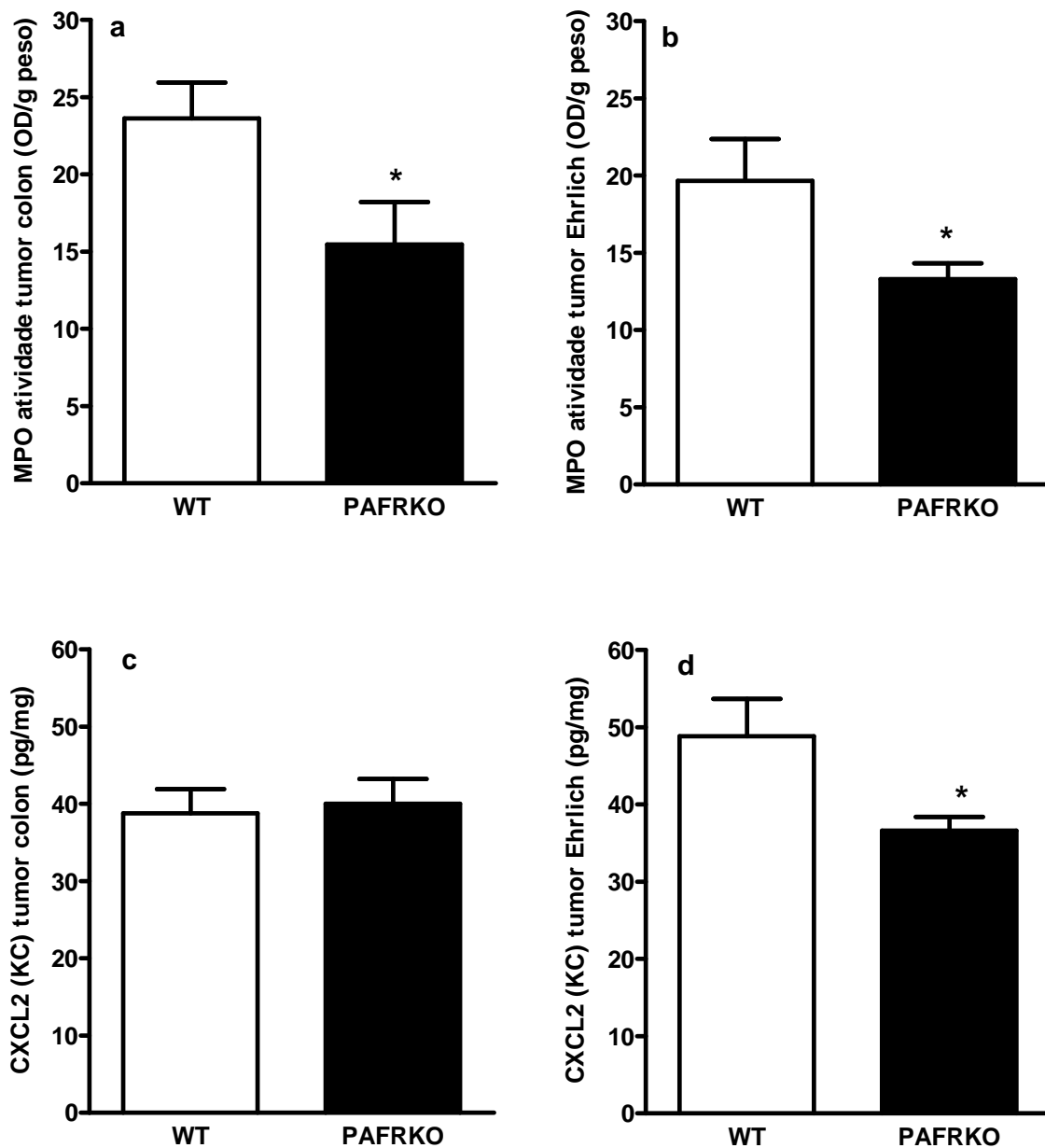


FIGURA 23 – AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE CÉLULAS NEUTRÓLIFOS E PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS NOS TUMORES DE CÓLON E EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO.

Os níveis de mieloperoxidase (MPO) foram menores nos tumores de cólon e Ehrlich (a e b) no grupo PAFR-KO. Os níveis de quimiocina CXCL2(KC) não apresentaram diferenças significativas no tumor de cólon nos dois grupos (c). No tumor de Ehrlich os níveis de CXCL2 (KC) estavam diminuídos nos animais PAFR-KO. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. de 10 animais em cada grupo. * $P < 0,05$.

O recrutamento de macrófagos foi avaliado pela atividade da enzima *N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (NAG). Os níveis de NAG no tumor de cólon e de Ehrlich foram menores no grupo nocaute (FIG. 24a e b). A quimiocina CCL2(MCP-1/JE) mostrou níveis semelhantes no tumor de cólon em ambos os grupos WT e PAFR-KO (FIG. 24c) e níveis menores no tumor de Ehrlich nos camundongos PAFR-KO (FIG. 24d)

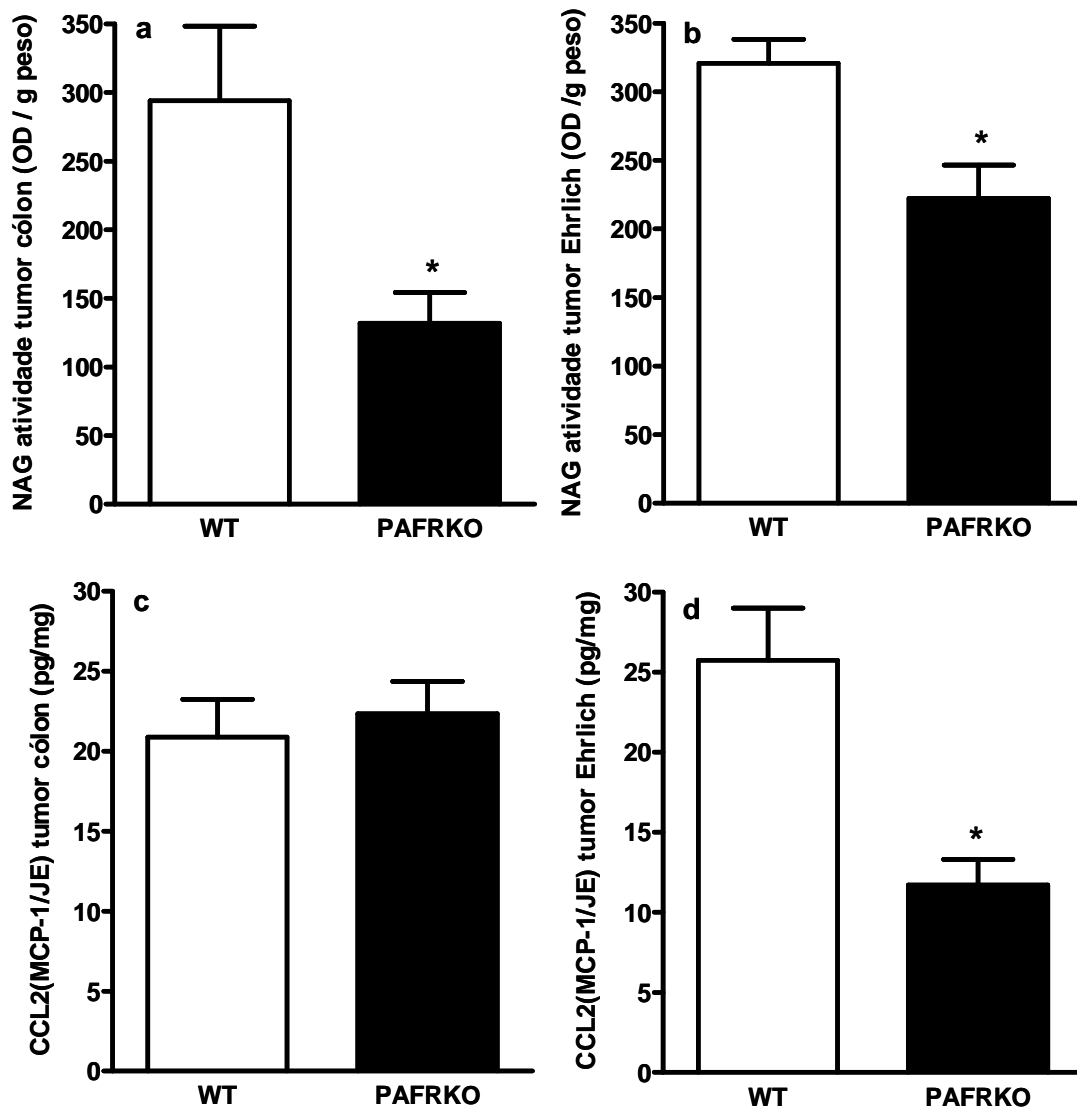


FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS E DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINA NOS TUMORES DE CÓLON E DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS WT E PAFR-KO. Os níveis de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) no tumor de cólon foram menores nos camundongos PAFR-KO (a). Os níveis de NAG no tumor de Ehrlich diminuíram no grupo PAFR-KO (b). Os níveis de CCL2(MCP-1/JE) foram semelhantes no tumor de cólon nos dois grupos (c) e aumentados no tumor de Ehrlich no grupo PAFR-KO. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. de 10 animais em cada grupo. * $P < 0,05$.

6. Sinopse dos principais resultados

6.1 CRESCIMENTO VASCULAR, INFLAMAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS IMPLANTES DE ESPONJA

WT	PARÂMETROS AVALIADOS	PAFR-KO
↑ ↑ ↑	Hb	↑ ↑ ↑
↑ ↓	VEGF	↑ ↓
↑ ↓	TNF- α	↑ ↓
↑ ↑ ↑	MPO	↑ ↑ ↑
↑ ↓	CXCL2(KC)	↑ ↓
↑ ↑ ↑	NAG	↑ ↑ ↑
↑ ↓	CCL2(MCP-1/JE)	↑ ↓

6.2 CRESCIMENTO VASCULAR, INFLAMAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS TUMORES DE CÓLON E EHRlich

TUMOR DE CÓLON		PARÂMETROS AVALIADOS	TUMOR DE EHRlich	
WT	PAFR-KO		WT	PAFR-KO
=	=	Peso (mg)	↓	↑
↓	↑	Hb	=	=
↓	↑	VEGF	↓	↑
↓	↑	TNF- α	=	=
↑	↓	MPO	↑	↓
=	=	CXCL2(KC)	↑	↓
=	↓	NAG	↑	↓
=	=	CCL2(MCP-1/JE)	↑	↓

↓ DIMINUIÇÃO
DIMINUIU

= SEM DIFERENÇA

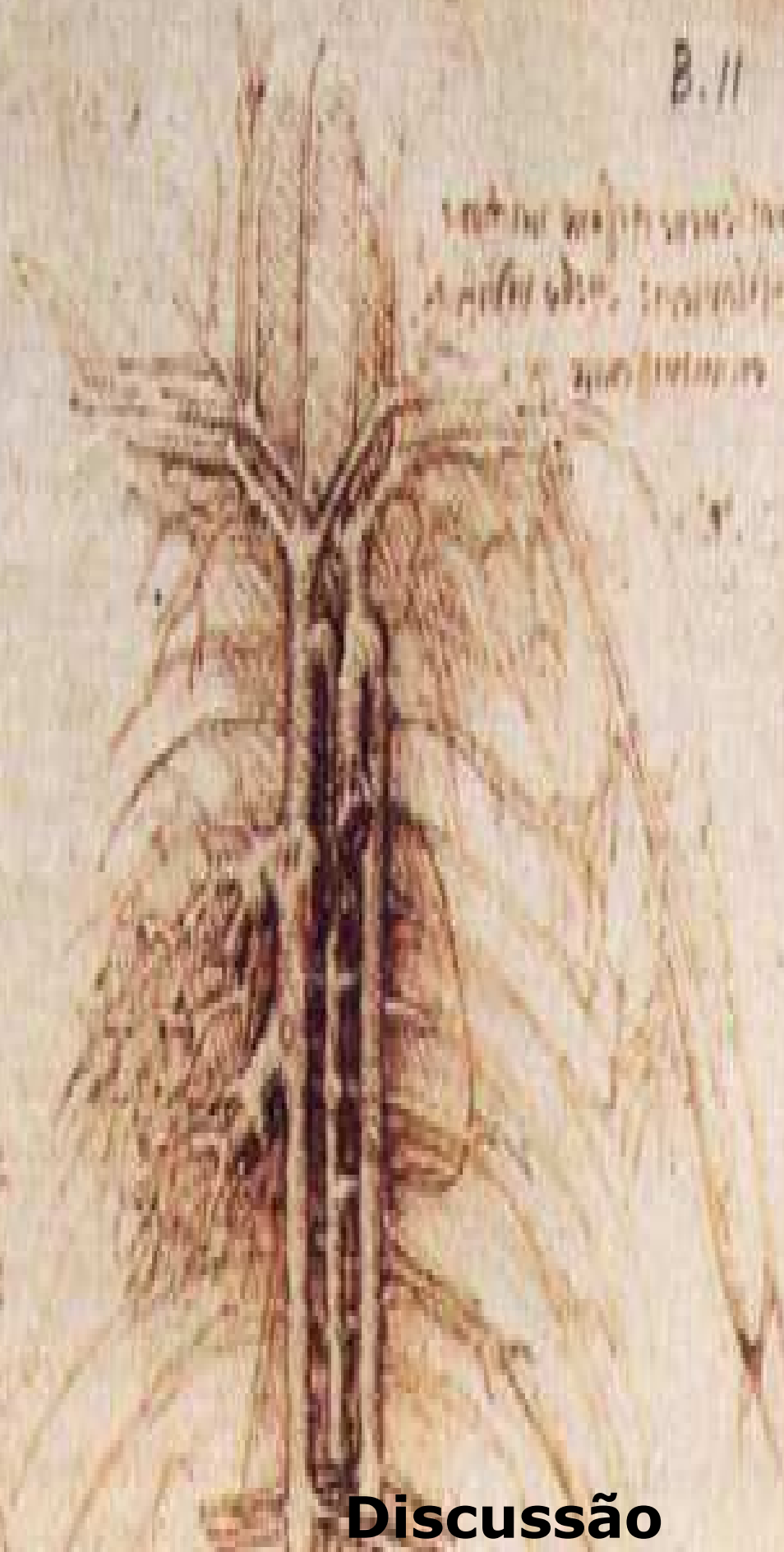
↑ AUMENTO

↑ ↓ AUMENTOU E

B.11

Handwritten text in a script, possibly Indic, located on the left side of the page.

Handwritten text in a script, possibly Indic, located in the upper right quadrant of the page.



Discussão

Handwritten text in a script, possibly Indic, located at the bottom left corner of the page.

Handwritten text in a script, possibly Indic, located at the bottom right corner of the page.

7. Discussão

O desenvolvimento seqüencial da angiogênese, inflamação e a produção de citocinas no tecido fibrovascular induzido pelo implante subcutâneo de esponja em camundongos nocaute (com deleção gênica) para o receptor do PAF (PAFR-KO) foi investigado. Além disso, o desenvolvimento dos tumores sólidos de Ehrlich e cólon nestes animais bem como os níveis de mediadores angiogênicos e inflamatórios nestes tecidos foram determinados.

O modelo experimental de implante de esponja *in vivo* para o estudo da angiogênese (Andrade et al., 1987; Hu et al., 1995; Wang H et al., 2000; Kim et al., 2001) tem sido utilizado para avaliar a formação do tecido fibrovascular, uma mimetização do processo de cicatrização de feridas. Este modelo tem permitido que a estrutura e função dos vasos neoformados possam ser avaliadas fisiológica, bioquímica, e morfometricamente. A utilização de modelos de implante tem possibilitado também a medida da área vascular (Dvorak et al., 1987), a contagem de vasos (Nguyen et al., 1994), a avaliação do fluxo sanguíneo através de marcadores radioativo (Andrade et al 1987; Fan & Polverini, 1997) e fluorimétrico (Andrade et al., 1997), a reatividade vascular a fármacos (Andrade et al., 1997) e a avaliação de moduladores inibidores e estimuladores angiogênicos (Belo et al 2004; Barcelos et al. 2004; Dellian et al., 1996). Wang et al (2000) desenvolveram técnicas de transferências de gene para estimular terapias angiogênicas usando implantes de esponjas em camundongos. Esta metodologia têm sido importante para o entendimento e manipulação da angiogênese.

As técnicas utilizadas neste trabalho que avaliaram a vascularização, a inflamação e a produção de citocinas têm sido amplamente validadas na aferição desses processos biológicos. Assim o ensaio fluorimétrico (Andrade et al., 1997; Lage & Andrade, 2000)

tem sido utilizado para avaliar a resposta vascular a variadas substâncias vasoativas em leitos vasculares neo formados e pré-existentes. A técnica de dosagem de hemoglobina (Hb) é uma avaliação quantitativa e bem estabelecida do índice vascular em vários tecidos (Plunkett et al., 1990 ; Passaniti et al., 1992; Hu et al., 1995; Teixeira et al., 1999; Belo et al. 2004). As dosagens das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e da *N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (NAG) (Mullane, et al., 1985; Bailey 1988; Cross, et al., 2003; Barcelos et al., 2005) correlacionam-se respectivamente, com a quantidade de neutrófilos e macrófagos recrutados, possibilitando demonstrar estes componentes inflamatórios de forma quantitativa nos vários processos em que participam. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também tem sido largamente utilizado para determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas em uma variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Salcedo et al., 2000; Barcelos et al., 2004; Belo et al., 2004).

A manipulação gênica de animais experimentais tem permitido o desenvolvimento de linhagens transgênicas as quais possibilitam elucidar o papel biológico de moléculas e as conseqüências de alterações gênicas no sistema fisiológico. Em 1997 uma linhagem de camundongos com deleção gênica para o receptor do PAF foi desenvolvida por Ishii et al. na qual a caracterização da importância deste mediador em processos fisiopatológicos foi avaliada.

Neste estudo, utilizando-se estes animais, uma série de atividades exercidas pelo PAF foi avaliada. Inicialmente, a deleção do gene, que codifica o receptor do PAF, nos camundongos PAFR-KO, foi confirmada pela ausência de resposta vaso constritora à administração exógena de PAF no leito vascular cutâneo através do método da difusão de fluoresceína (Andrade et al., 1997; Lage & Andrade, 2000).

Na avaliação da resposta da angiogênese inflamatória, induzida por implante de esponja, foi observado que os camundongos PAFR-KO exibiram um aumento da angiogênese demonstrada pelo conteúdo de hemoglobina (índice vascular) das esponjas e pela análise morfométrica. A análise morfométrica dos implantes mostrou uma aparente discrepância, entre o número de vasos e o aumento progressivo no conteúdo de hemoglobina nos implantes que pode ser explicada pela maturação e, pelo estado funcional dos vasos sangüíneos na fase mais tardia do experimento (10 e 14 dias). Nesta fase é possível que tenha ocorrido anastomoses como sugere os dados da análise da área vascular aumentada do 7º para o 14º dia principalmente no grupo PAFR-KO.

Foi interessante observar que o aumento da angiogênese também ocorreu nos implantes dos camundongos WT tratados sistemicamente com o antagonista do PAF, UK 74505. Esse resultado exclui a possibilidade de alterações conseqüentes à deficiência do receptor do PAF, ou seja, de que a inativação de outros genes, além do gene que codifica o receptor do PAF tenha influenciado os experimentos. Nossos resultados, entretanto, vão de encontro ao estudo de Jackson et al., 1998, o qual demonstrou uma inibição da angiogênese em granuloma da bolsa de ar em murinos pelo Ro 24-4736, um outro antagonista do PAF. Uma explicação possível para esta discrepância pode estar nas diferenças entre os tipos de animais e no modelo utilizado, no composto e na escolha da dose. É particularmente relevante notar que o estímulo inflamatório (óleo de cróton e adjuvante de Freund's), usado por Jackson et al., 1998, foi mais intenso que o promovido em nossos experimentos (simples presença de esponja) e que eles reportam um aumento no tamanho do granuloma, enquanto em nossos experimentos, não foi observada qualquer alteração no peso dos implantes após administração sistêmica do UK 74505. É possível que o efeito do PAF como um

mediador pro ou anti-angiogênico varie com o ambiente inflamatório no qual a angiogênese ocorre.

As alterações vasculares observadas nos camundongos nocaute foram acompanhadas pela diminuição dos sinais inflamatórios. Foi interessante observar que a angiogênese, usualmente considerada como consequência direta dos eventos inflamatórios como infiltração e ativação celular (Jackson et al., 1998), teve de fato um aumento acima do normal nos camundongos PAFR-KO onde, o acúmulo de leucócitos foi menor em relação ao controle. Estes achados contrastam marcadamente com a estimulação da angiogênese induzida pelo PAF *in vitro* e *in vivo* (Andrade et al., 1992; Bussolino et al., 1995; Camussi et al., 1995; Montrucchio et al., 2000a, b). Outra discrepância em nossos resultados foi que, embora houvesse uma angiogênese aumentada nos implantes de animais PAFR-KO, os níveis das duas citocinas proangiogênicas, VEGF e TNF- α , não foram alterados nestes animais. Ambos VEGF e TNF- α têm um importante papel na angiogênese (Fräter-Schröder et al., 1987; Brown et al., 1997) e o PAF estimula a expressão de fatores de crescimento e citocinas em uma variedade de tecidos (Bussolino et al., 1995; Zhixing et al., 1995). Fica claro que nos camundongos PAFR-KO, os níveis de VEGF ou de TNF- α normalmente induzidos, isto é, os mesmos níveis que nos camundongos WT, não foram fatores limitantes para a angiogênese e ainda, o PAF não foi um estímulo crucial para a produção desta citocinas. É possível também que outros estímulos endógenos para a produção destas citocinas tenham participado do processo. Por exemplo, o VEGF é abundantemente produzido por células tumorais em hipóxia e células endoteliais ativadas, macrófagos e outras células do sistema imune (Brown et al., 1997) e a produção de VEGF pelos fibroblastos de camundongo em cultura foi mostrada ter sido controlada pela produção de cicloxigenase-2 (COX-2) (Williams et al., 2000). O pico, posterior, de

produção de citocinas nos camundongos PAFR-KO é mais aparente que real, pois os níveis de VEGF ou TNF- α não diferem entre os dias 7 e 10.

Em animais que crescem e desenvolvem inteiramente sem receptores de PAF, vias compensatórias para a ausência de suas ações provavelmente surgem. Entretanto, nossos resultados sugerem que as alterações na geração e sinalização de citocinas ou quimiocinas e nos efeitos do PAF são seletivamente influenciados na linhagem PAFR-KO.

O PAF é um fosfolipídio endógeno capaz de mediar muitos efeitos biológicos diferentes. Muitos destes eventos estão envolvidos com inflamação, mas o PAF também possui efeitos fisiopatológicos na reprodução, nos sistemas nervoso e cardiovascular (Montrucchio et al., 2000; Ishii & Shimizu, 2000). Ademais, o PAF tem um importante papel no crescimento e transformação celular (Bennett et al., 1993; Roth et al., 1996; Kume & Shimizu, 1997). Nossos resultados mostraram claramente que a ausência do receptor do PAF e, portanto dos efeitos de sua ligação, leva a uma diminuição no acúmulo de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) nos implantes de esponja. Essa diminuição na infiltração de células pro-inflamatórias nos implantes dos camundongos PAFR-KO é completamente compatível com as ações pro-inflamatórias atribuídas ao PAF nos animais normais (WT) (Venable et al., 1993; Ford et al., 1989; Jackson et al.; 1998). A diminuição no acúmulo de leucócitos foi mais claramente marcante para os neutrófilos nos animais nocautes do que nos animais WT. Este nível mais baixo no 7º dia após a implantação continuou durante todo o período do experimento (14 dias). Os níveis de macrófagos estavam diminuídos somente no fim do período, entre o 10º e 14º dia. Ademais a magnitude do decréscimo na atividade dos macrófagos foi menor que nos neutrófilos, sugerindo um grau de seletividade na perda dos sinais inflamatórios.

Foram surpreendentes os dados de que, nos camundongos PAFR-KO, os níveis de relevantes citocinas quimiotáticas, as quimiocinas, CXCL2(KC) e CCL2(MCP-1/JE), estivessem mais elevados que nos animais WT. Estas quimiocinas, em camundongos WT, funcionam como agentes quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos, respectivamente, e níveis aumentados das mesmas estão associados com aumento do recrutamento de leucócitos, *in vitro* ou *in vivo* (Rollins, 1997). Assim, nos camundongos PAFR-KO, o decréscimo no acúmulo de leucócitos e o aumento nos níveis de quimiocinas sugerem que os leucócitos em animais PAFR-KO estão de algum modo, defeituosos em sua resposta aos estímulos quimiotáticos. Duas possíveis explicações para tal defeito são a falta de receptores para as quimiocinas ou a falta de uma via de sinalização intracelular. A falta do próprio receptor pode ser expressa como uma redução numérica dos receptores normais ou como receptores anormais com reduzida afinidade pelos ligantes. Talvez a melhor alternativa, defeito na sinalização intracelular poderia ser compatível com as ações intracelulares, que é sabido serem exercidas pelo PAF nas células dos animais normais WT. Um recente trabalho (Marrache et al., 2002) mostra evidências para um receptor do PAF na membrana nuclear intimamente relacionado a receptores da membrana celular e reconhecido pelos mesmos anticorpos e pelos mesmos antagonistas. A ativação deste receptor nuclear do PAF causa a ativação de quinases reguladas por sinal extracelular e de quinases reguladas extracelularmente, do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e da indução da sintase óxido nítrico (NOS) e a via da COX-2 (Marrache et al., 2002; Gobeil et al., 2003). A estimulação diminuída de tais cascatas de quinases, conseqüente à perda de receptores nucleares do PAF nos camundongos PAFR-KO, poderia levar à perda de ligação entre receptores celulares de quimiocinas.

Além de possíveis mecanismos alterados da resposta celular, a discrepância entre o nível de quimiocina e o acúmulo celular levanta outra interessante questão – é a produção aumentada de quimiocinas indicativo da perda do sistema de “feedback” nos camundongos PAFR-KO? Resultados experimentais existentes, sobre uma relação normal resposta-concentração entre concentração de quimiocina e influxo celular tem sido postulada e geralmente observada. Entretanto, nos animais PAFR-KO, a produção de quimiocinas foi maior que nos camundongos WT, embora um mediador pró-inflamatório, o PAF, tenha sido bloqueado. Uma sinalização de “feedback” negativo emanando de leucócitos recrutados poderia talvez ser uma forma lógica de controle da atividade quimiotática mas não há modelo, até agora, no qual tal controle tenha sido implicado ou expressado. Todavia, em nosso modelo de angiogênese, o implante de esponja e a perda de sinalização do PAF através do receptor do PAF mais estimularam a neovascularização que a inibiu.

Nossos resultados também sugerem que o acúmulo de leucócitos pode ser uma fonte de sinais antiangiogênicos sob condições normais, isto é, em animais WT. Assim, quando os leucócitos não são recrutados no sítio angiogênico-inflamatório, o processo de angiogênese prossegue descontroladamente. Em cultura de leucócitos, já foi detectada a presença de uma potente molécula com funções antiangiogênicas, a angiostatina “Kringle 3”, (Scapini et al., 2002).

Era esperado que estes experimentos em camundongos PAFR-KO pudessem confirmar o papel positivo do PAF na inflamação e angiogênese. De fato, nossos resultados confirmaram os efeitos pró-inflamatórios do PAF endógeno. No entanto, surpreendentemente mostraram que o PAF endógeno funciona como um inibidor do processo angiogênico, em nosso modelo de esponja. Além disso, o acúmulo de células inflamatórias no sítio de neovascularização pode

servir tanto como fonte de inibidores endógenos de angiogênese como fonte de estimuladores do processo. Esse inesperado papel do PAF na angiogênese inflamatória nos levou a conduzir experimentos em tumores sólidos considerando a estreita co-dependência entre inflamação e angiogênese no desenvolvimento tumoral (Folkman, 1995; Balkwill, 2002).

Os dois tumores avaliados Ehrlich e cólon são bem caracterizados quanto aos mecanismos envolvidos na tumorigênese (Fecchio, 1990; Hsu et al., 1995; Ahmad et al., 2001).

O tumor de Ehrlich no grupo nocaute apresentou um crescimento exacerbado e níveis elevados de VEGF. Apesar disso, não houve modificação no conteúdo de hemoglobina no tecido tumoral em relação ao grupo WT. É possível que neste tumor o desenvolvimento excessivo das células parenquimatosas não dependa totalmente da angiogênese. Em alguns tumores isto tem sido demonstrado (Denekamp & Hobson, 1982). Além disso, pode ter havido um aumento do parênquima sem um aumento suficiente da rede vascular. Isto leva a extensas áreas de necrose como observada neste tumor (dados não mostrados). Neste caso, a hemoglobina é degradada em hemossiderina a qual não é detectada pelo método de Drabkin. Isto poderia também explicar o aumento nos níveis de VEGF o qual é produzido em situações de hipóxia (Ferrara & Alitalo, 1999; Harris, 2002). A inflamação, outro parâmetro importante associado ao desenvolvimento tumoral foi avaliada pela atividade das enzimas MPO e NAG e os níveis das quimiocinas CXCL2/KC e CCL2/MCP-1/JE. No tumor de Ehrlich as atividades destas enzimas bem como os níveis das quimiocinas estavam diminuídos nos animais nocautes, confirmando o efeito pro-inflamatório do PAF. Portanto, parece que nesse tumor os componentes inflamatórios foram afetados pelo bloqueio do receptor do PAF impedindo assim uma maior vascularização tumoral.

O tumor de cólon não apresentou diferença significativa no crescimento nos dois grupos de animais. Entretanto, os níveis de hemoglobina/angiogênese foram significativamente maiores nos animais KO, cerca de 40%, em relação ao tecido tumoral dos animais WT. Neste tumor os níveis de VEGF e TNF- α estavam aumentados, diferentemente do observado no tumor de Ehrlich. Os níveis aumentados destas citocinas pró-angiogênicas no tumor de cólon podem explicar o aumento da angiogênese como determinado pelo conteúdo de hemoglobina. O TNF aumenta a expressão de VEGF e é angiogênico podendo agir como um promotor tumoral endógeno, contribuindo para o remodelamento tecidual e desenvolvimento do estroma (Balkwill, 2002).

Nós esperávamos que o crescimento tumoral, a angiogênese e a inflamação diminuíssem na linhagem PAFR-KO. Nossos resultados foram claros, mas inesperados. Nos camundongos nocautes, não houve inibição do crescimento ou da angiogênese, mas decréscimo de alguns aspectos da inflamação. Além disso, os resultados diferiram entre os dois tumores estudados. Nos animais nocautes, embora os efeitos do PAF estejam ausentes (Ishii & Shimizu, 2000; Ferreira et al., 2004), a síntese de PAF não foi afetada. Conseqüentemente, os níveis de PAF podem estar normais nos sítios inflamatórios. Nesses animais pode até mesmo ter havido níveis acima do normal de PAF extracelular uma vez, que não havia receptores para ligar o mediador às células. Esta é uma importante consideração porque, em contraste com o tecido hospedeiro dos camundongos nocautes, as células tumorais tiveram níveis inalterados de receptores de PAF abeis para responder ao PAF derivado do hospedeiro ou ao PAF produzido por elas mesmas. Esta resposta é a estimulação do crescimento em um número de linhagens de células tumorais (Baldi et al., 1994; Bussolati et al., 2000; Laurenzana et al., 2005) e o PAF tem sido associado com o crescimento tumoral em exemplos clínicos (Pitton et

al., 1989; Denizot et al., 2003). O resultado prático dessas possibilidades em nosso contexto é que a taxa de crescimento total das células tumorais nos camundongos PAFR-KO podem depender mais da resposta do tumor ao PAF do que da resposta do hospedeiro. Por exemplo, algumas células da leucemia mieloide não expressam receptores para o PAF (Berdel et al., 2005) e amostras de cânceres de tireóide humano mostram níveis normais de PAF e enzimas relacionadas (Denizot et al., 2005). Neste nosso trabalho, a marcada estimulação do tumor de Ehrlich, mas não do tumor de cólon 26 poderia refletir tal sensibilidade diferenciada das duas linhagens de tumor para o PAF.

O componente inflamatório destes tumores foi também afetado pelo bloqueio do receptor do PAF. Foi observado que a atividade das enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG) encontravam-se diminuídas no grupo PAFR-KO. Apesar disto, as quimiocinas CXCL2(KC) e CCL2(MCP-1/JE) mantiveram seus níveis semelhantes nos dois grupos. Essa discrepância talvez possa ser explicada pela produção dessas substâncias pelas células do tumor de cólon. Vários estudos mostram uma variedade de quimiocinas detectadas em tecidos neoplásicos como produtos de células tumorais ou de elementos do estroma. Isto inclui as quimiocinas CXCL2(KC) e a CCL2/MCP-1/JE. A primeira quimiocina é importante no recrutamento e ativação de neutrófilos e estimulação da angiogênese na córnea e no modelo de implante de esponjas (Strieter et al., 2004; Barcelos et al., 2004). A segunda, CCL2(MCP-1/JE) está envolvida no recrutamento de monócitos, ativação de macrófagos, tem efeito angiogênico direto e indireto e é a citocina CC mais freqüente em tumores (Salcedo et al., 2000; Mantovani et al., 2002; Barcelos et al., 2004). As quimiocinas nos tumores são mais que substâncias quimiotáticas para leucócitos. Quimiocinas CC ativam um restrito e distinto programa nos monócitos (Locati et al., 2002), incluindo metaloproteinases da matriz (MMPs) e

citocromo CYP1B1, envolvidos na carcinogênese. Células tumorais não só expressam receptores para quimiocinas, mas podem responder a esses mediadores aumentando a proliferação e a sobrevivência. Finalmente, o recrutamento de leucócitos dirigidos por quimiocinas resulta em digestão da matriz extracelular que pavimentava o caminho para as células tumorais levando às primeiras lesões (Opdenakker & Van Damme, 1992). Nossos resultados estão, entretanto, de acordo com trabalhos prévios, uma vez que a resposta inflamatória geral, em termos de leucócitos, estava diminuída no total nos camundongos PAFR-KO. A inflamação tem sido positivamente correlacionada com câncer por muitos anos, talvez desde Virchow (Balkwill & Mantovani, 2001), e há poucos anos atrás, a conexão entre inflamação e câncer tem sido explorada em detalhes bem como, vários componentes da reação inflamatória têm sido melhores definidos (Wilson et al., 2005; Balkwill et al., 2005; Jackson & Evers, 2006). Um desses componentes de relevância aqui é o grupo dos mediadores protéicos, as citocinas. Nós medimos três deles, TNF- α , uma citocina pleiotrópica pro-inflamatória e duas citocinas com atividades predominantemente quimioatraentes (quimiocinas), CXCL2 e CCL2.

Embora estas quimiocinas sejam potentes agentes quimioatraentes e seletivos para diferentes tipos de leucócitos, o sistema quimiocina é notavelmente promiscuo (Pease & Williams, 2006). Assim, monócitos expressam mais de seis receptores de quimiocina e o receptor para CCL2, CCR2, é ativado por pelo menos três outras quimiocinas. As quimiocinas têm também importantes ações sobre outros tipos celulares, notadamente as células endoteliais, incluindo liberação de outros mediadores. Por exemplo, CCL2 (também conhecido como MCP-1) age em culturas de células endoteliais acarretando alterações pro-angiogênicas e liberação de VEGF (Salcedo et al., 2000; Hong et al., 2005). Ainda outro alvo são

as células tumorais as quais expressam receptores de quimiocinas mediando metástases e sobrevivência (Balkwill, 2004). Apesar de tudo, quimiocinas são um determinante maior do tipo e número de leucócitos acumulados nos sítios inflamatórios e, em tumores, atenção particular tem sido dada aos macrófagos associados a tumores como fatores críticos para a proliferação tumoral (Sica et al., 2006; Bingle et al., 2006). Tendo em mente esta diversidade de fontes, alvos e ações, simples correlações entre os níveis de CXCL2 e o número de neutrófilos ou CCL2 e macrófagos, correlações derivadas de sua seletividade de ação quimioatraente *in vitro*, são menos prováveis de ser cumprido *in vivo*. Neste trabalho, o tumor de Ehrlich mostrou uma consistente redução de quimiocinas e infiltração de leucócitos nos camundongos PAFR-KO e no tumor de cólon 26, essas variáveis não mostraram aumento na linhagem KO. No total, nossos resultados sugerem que a associação entre inflamação e crescimento tumoral é livre e facilmente perturbada por alterações conseqüentes a “inativação” de um importante mediador inflamatório como o PAF.

Ambos os tumores exibiram níveis elevados de VEGF nos camundongos PAFR-KO e nenhuma indicação de diminuição da formação de vasos sanguíneos ou vascularização diminuída. E é por isso difícil resistir a simples dedução de que o PAF endógeno em nosso modelo age para conter a secreção de VEGF e angiogênese, uma dedução inteiramente oposta a daquelas derivadas da maioria dos resultados experimentais. Entretanto, nossos resultados foram compatíveis com a correlação positiva entre angiogênese e crescimento tumoral. Eles também podem suportar o conceito de controle de tal crescimento pela inibição da angiogênese, mas mais importante seria predizer que os antagonistas do PAF potencializariam mais que inibiriam o crescimento tumoral. O potencial angiogênico aumentado nos camundongos PAFR-KO e a sugerida regulação para

baixo da angiogênese pelo PAF endógeno é uma surpresa, mas também um achado reprodutível.

O efeito do PAF endógeno foi avaliado em dois tecidos proliferativos que apresentam ao mesmo tempo características comuns e distintas. Assim, enquanto o modelo de implante de esponja induziu a formação de um tecido fibrovascular, a inoculação subcutânea de células tumorais induziu a formação de tumores sólidos. Tanto o tecido fibrovascular (tecido de granulação) quanto o estroma tumoral apresentaram componentes vasculares e inflamatórios. Entretanto, estes tecidos responderam diferencialmente ao bloqueio do receptor do PAF. A inflamação foi afetada de forma similar nos diferentes tecidos com a diminuição das enzimas MPO e NAG. A angiogênese foi predominantemente aumentada nestes tecidos pelo bloqueio do receptor do PAF.

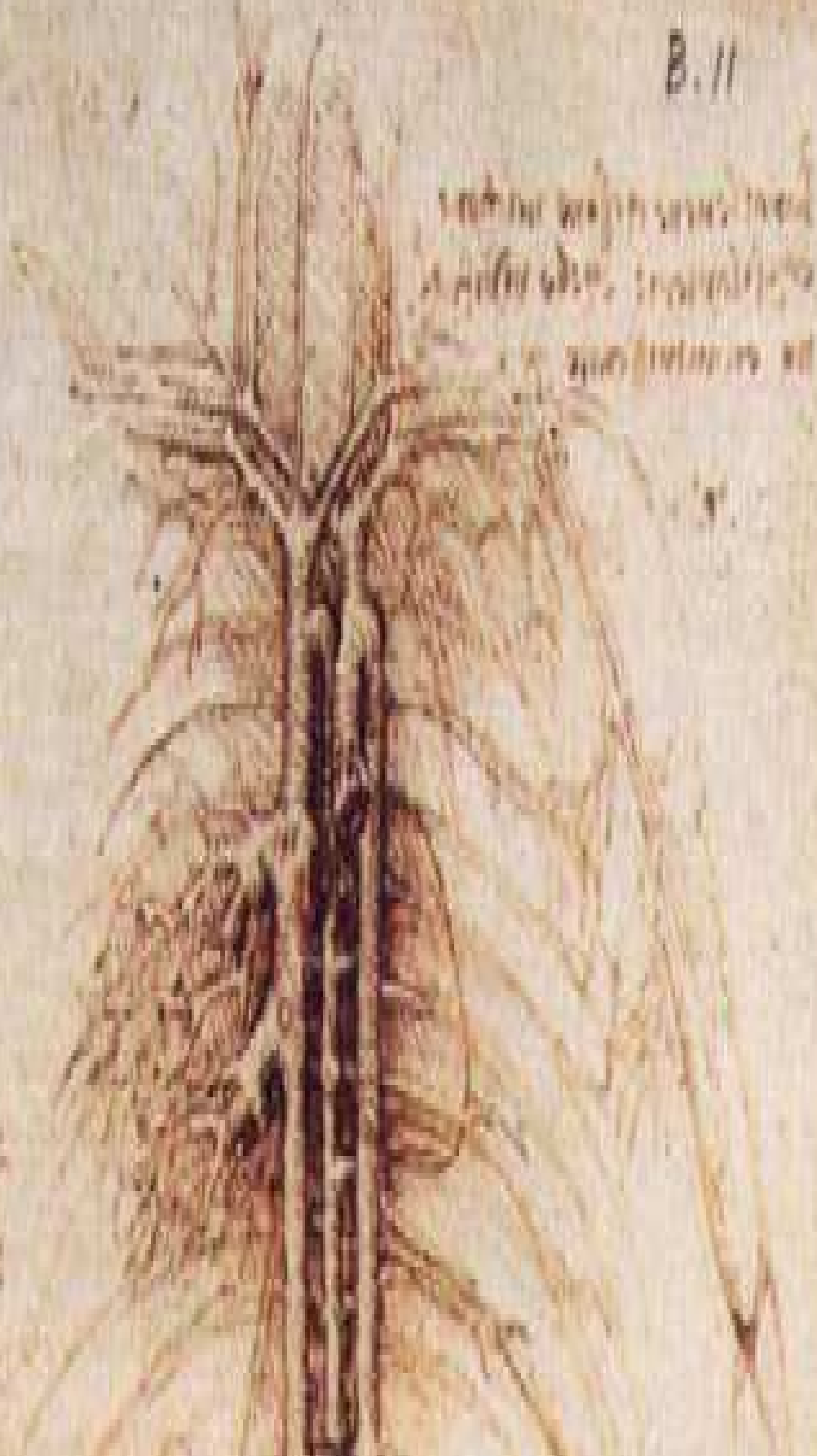
Em resumo, nós esperávamos, com os camundongos mutantes, confirmar os efeitos pro-angiogênicos e pro-inflamatórios do PAF endógeno e observar, como conseqüência, diminuição da angiogênese inflamatória e crescimento tumoral. Embora nós tenhamos confirmado os efeitos pro-inflamatórios do PAF, a ligação entre inflamação e crescimento tumoral não foi tão óbvia em nossos camundongos mutantes, como tinha sido reportado previamente (Balkwill & Mantovani, 2001; Jackson & Evers, 2006). Finalmente, nosso trabalho enfatizou que os resultados em camundongos com deleção gênica não são sempre aqueles razoavelmente esperados. As razões para as discrepâncias entre os efeitos angiogênicos do PAF nas linhagens mutante e normal precisam ainda ser estabelecidas.

Esse trabalho sugere que o fator ativador de plaquetas (PAF) possa ser incluído na lista de inibidores endógenos da angiogênese, à semelhança de outros compostos tais como; endostatina, angiostatina, etc. Entretanto, esta hipótese deverá ser confirmada em

outros modelos antes que sua relevância para a fisiopatologia da angiogênese possa ser completamente validada.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located on the left side of the page.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located in the upper right quadrant.



Conclusão

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom left corner.

Handwritten text in a non-Latin script, possibly Telugu, located at the bottom right corner.

8. Conclusão

Os modelos de animais transgênicos têm sido usados para elucidar o papel biológico de moléculas possibilitando avaliar as conseqüências de alterações gênicas do sistema fisiológico.

Nosso trabalho nos permitiu as seguintes conclusões:

- A utilização de animais nocautes para o receptor do PAF possibilitou investigar o papel endógeno deste mediador demonstrando seu efeito modulador na angiogênese, inflamação e crescimento tumoral.
- O PAF parece ser um mediador fisiológico da inflamação que regula negativamente a angiogênese em nosso modelo de implante de esponja e nos tumores de Ehrlich e cólon.
- O bloqueio do receptor do PAF influenciou negativamente a inflamação do tecido fibrovascular e do tecido tumoral.
- No desenvolvimento tumoral o PAF promove efeitos distintos que podem estar associados aos componentes vasculares e inflamatórios de cada tumor.
- A angiogênese no tumor de cólon parece depender mais das citocinas pro-angiogênicas do que do recrutamento de células inflamatórias diferentemente do tumor de Ehrlich.
- A inibição gênica do PAF influenciou diferencialmente o crescimento e a vascularização dos dois tumores estudados

(estimulou o crescimento do tumor de Ehrlich e a angiogênese no tumor de cólon) o que pode ser devido às características intrínsecas (origem, microambiente, componentes do estroma) de cada tecido tumoral.

- Este estudo contribuiu para uma melhor definição do papel do PAF na angiogênese, inflamação e no desenvolvimento dos tumores estudados.



Referência Bibliográfica

9. Referências Bibliográficas

1. ADDISON, C.L.; DANIEL, T.O.; BURDICK, M.D.; LIU, H.; EHLERT, J.E.; XUE, Y.Y.; BUECHI, L.; WALZ, A.; RICHMOND, A. & STRIETER, R.M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.*, **165**(9), 5269-5277.
2. AHMAD, S.A.; LIU, W.; JUNG, Y.D.; FAN, F.; WILSON, M.; REINMUTH, N.; SHAHEEN, R.M.; BUCANA, C.D. & ELLIS, L.M. (2001). The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.*, **61**(4), 1255-1259.
3. AKAGI, Y.; LIU, W.; XIE, K.; ZEBROWSKI, B.; SHAHEEN, R.M. & ELLIS, L.M. (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta. *Britsh. J. Canc.* **80**, 1506-1511.
4. ALABASTER, V.A.; KEIR, R.F.; PARRY, M.J. & DE SOUZA, R.N. (1991). UK-74505, a novel and selective PAF antagonist, exhibits potent and long lasting activity in vivo. *Agents Actions Suppl.*, **34**, 221-227.
5. ALTERMAN, A. L.; FORNABIO, D. M. & STACKPOLE, C. W. (1985). Metastatic dissemination of B16 melanoma: pattern and sequence of metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**, 691-702.
6. ANDRADE, S.P.; FAN, T.P. & LEWIS, G.P. (1987). Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp*

- Pathol.*, **68**(6), 755-66.
7. ANDRADE, S.P.; BAKHLE, Y.S.; HART, I. & PIPER, P.J. (1992a). Effects of tumour cells on angiogenesis and vasoconstrictor responses in sponge implants in mice. *Br J Cancer*, **66**(5), 821-826.
 8. ANDRADE, S. P.; MACHADO, R. D. P.; TEIXEIRA, A. S.; BELO, A. V.; TARSO, A. M. & BERALDO, W. T. (1997). Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc. Res.*, **54**, 253-261.
 9. ANDRADE, S. P.; VIEIRA, L. B. G. B.; BAKHLE, Y. S. & PIPER, P. J. (1992b). Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. *Int. J. Exp. Pathol.*, **73**, 503-513.
 10. ARNOLD, F. & WEST, D.C. (1991). Angiogenesis in wound healing. *Pharmac. Ther.*, **52**, 407-422.
 11. AUSPRUNK, D.H. & FOLKMAN, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.*, **14**(1), 53-65.
 12. BALDI, E.; BONACCORSI, L.; FINETTI, G.; LUCONI, M.; MURATORI, M.; SUSINI, T.; FORTI, G.; SERIO, M. & MAGGI, M. (1994). Platelet-activating factor in human endometrium. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **49**, 359-363

13. BAILEY, P. J. (1988). Sponge implants as models. *Meth. Immunol.*, **162**, 327-334.
14. BALKWILL, F. (2002). Tumor necrosis factor or tumor promoting factor ? *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 135-141.
15. BALKWILL, F. (2003) Chemokine biology in cancer. *Semin. Immunol.* **15**,49-55.
16. BALKWILL, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature*, **4**, 540-550.
17. BALKWILL, F.; CHARLES, K. A. & MANTOVANI, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*, **7**, 211-217.
18. BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet*, **357**, 539-545.
19. BARCELOS, L. S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A. S.; CASSALI, G. D.; ANDRADE, S. P. & TEIXEIRA, N. M. (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm. Res.*, **53**, 576-584.
20. BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P. & TEIXEIRA, N.M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J. Leukoc. Biol.*, **78**(2), 352-358.

21. BAZAN, H. E.; REDDY, S. T. & LIN, N. (1991). Platelet-activating factor (PAF) accumulation correlates with injury in the cornea. *Exp Eye Res.*, **52**(4), 481-91.
22. BAZAN, J. F.; BACON, K. B.; HARDIMAN, G.; WANG, W.; SOO, K.; ROSSI, D.; GREAVES, D. R.; ZLOTNIK, A. & SCHALL, T. J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, **385**(6617), 640-644.
23. BAZAN, N. G.; SQUINTO, S. P.; BRAQUET, P.; PANETTA, T. & MARCHESELLI, V. L. (1991). Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids.*, **26**(12), 1236-1242.
24. BAZAN, N. G. (1998). The neuromessenger platelet-activating factor in plasticity and neurodegeneration. *Prog Brain Res.*, **118**, 281-91.
25. BELO, A. V.; BARCELOS, L. S.; FERREIRA, M. A. N. D.; TEIXEIRA, M. M. & ANDRADE, S. P. (2004). Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sciences*, **74**, 2827-2837.
26. BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.*, **68**(1), 1-8.
27. BEN EZRA, D. (1978). Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants.

Am. J. Ophthalmol., **86**,455-461.

28. BENELLI, R.; MORINI, M.; CARROZZINO, F.; FERRARI, N.; MINGHELLI, S.; SANTI, L.; CASSATELLA, M.; NOONAN, D. M. & ALBINI, A. (2002). Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J.*, **16**(2), 267-9.
29. BENJAMIN, L. E.; HEMO, I. & KESHET, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.*, **125**(9), 1591-1598.
30. BENJAMIN, L. E. & KESHET, E. (1997). Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**(16), 8761-8766.
31. BENNETT, S. A.; LEITE, L. C. & BIRNNBOIM, H. C. (1993). Platelet activating factor, an endogenous mediator of inflammation, induces phenotypic transformation of rat embryo cells. *Carcinogenesis*, **14**, 1289-1296.
32. BERDEL, W.E.; KULIMOVA, E.; KOLKMEYER, A.; ZUHLSDORF, M.; SERVE, H.; BUCHNER, T. & OELMANN, E. (2005). Receptor for platelet-activating factor (PAF) is not detectable by flow cytometry on the surface of myeloid leukemic cells. *Ann. Hematol.*, **84**, 771-773.

33. BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; MORBIDELLI, L.; ZICHE, M.; SANTONI, A.; CAPOGROSSI, M.C. & NAPOLITANO, M. (2003). Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.*, **273**(1-2), 83-101.
34. BIAN, X. W.; CHEN, J. H.; JIANG, X. F.; BAI, J. S.; WANG, Q. L. & ZHANG, X. (2004). Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol.*, **4**(12), 1537-47.
35. BINGLE, L.; LEWIS, C. E.; CORKE, K. P.; REED, M. W. & BROWN N. J. (2006). Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British J. Cancer*, **94**, 101-107.
36. BKAILY, G.; CHOUFANI, S.; HASSAN, G.; EL-BIZRI, N.; JACQUES, D. & D'ORLEANS-JUSTE, P. (2000). Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **36**(5 Suppl 1), S414-S417.
37. BORISH, I. C. & STEINKE, J. W. (2003). Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **11**, S460-S475.
38. BOS, A. J.; WEVER, R.; HAMERS, M. N. & ROOS, D. (1981). Some enzymatic characteristic of eosinophil peroxidase from patients with eosinophilia and from healthy donors. *Infect. Immun.*, **32**(2), 427-431.
39. BOUCHER, Y.; BAXTER, L. T. & JAIN, R. K. (1990) Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors:

- implications for therapy. *Canc.Res.* **50**, 4478-4484.
40. BRADLEY, J.R.; THIRU, S. & POBER, J.S. (1995). Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, **146**(1), 27-32.
41. BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D. & ROTHSTEIN, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. invest. Dermat.*, **78**, 206-209.
42. BRAQUET, P.; ESANU, A.; BUISINE, E.; HOSFORD, D.; BROQUET, C. & KOLTAI, M. (1991). Recent progress in ginkgolide research. *Med Res Rev.*, **11**(3), 295-355.
43. BRASILEIRO-FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios de crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO-FILHO, G.. Bogliolo – Patologia. 6ª ed. Belo Horizonte: Ed. Guanabara Koogan, 2000. cap. 8, p. 149-193.
44. BROWN, L.F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J.A.; FENG, D.; DVORAK, A.M. & DVORAK, H.F. (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Experientia Supplementum (basel)*, **79**, 233-269.
45. BROWN, N.S. & BICKNELL, R. (1998) Thymidine phosphorylase 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Bioch. J.*, **334**, 1-8.

46. BUSSOLATI, B.; BIANCONE, L.; CASSONI, P.; RUSSO, S.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; MONTRUCCHIO, G. & CAMUSSI, G. (2000). PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *A. J. Pathol.*, **157**, 1713-1715.
47. BUSSOLINO, F.; ALBINI, A.; CAMUSSI, G.; PRESTA, M.; VIGLIETTO, G.; ZICHE, M. & PERSICO, G. (1996). Role of soluble mediators in angiogenesis. *European Journal of Cancer*, **32A**, 2401-2412.
48. BUSSOLINO, F.; ARESE, M.; MONTRUCCHIO, G.; BARRA, L.; PRIMO, L.; BENELLI, R.; SANAVIO, F.; AGLIETTA, M.; GHIGO, D.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; BOSIA, A.; ALBINI, A. & CAMUSSI, G. (1995). Platelet-activating factor produced in vitro by Kaposi's sarcoma cells induces and sustains in vivo angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **96**, 940-952.
49. BURKE, P. A. & DeNARDO, S. J. (2001). Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, **39**(1-2),155-171.
50. CAMUSSI, G.; AGLIETTA, M.; MALAVASI, F.; TETTA, C.; SANAVIO, F.; PIACIBELLO, W. & BUSSOLINO, F. (1983). The release of platelet activating factor from human endothelial cells in culture. *J. Immunol.*, **131**, 2397-2403.
51. CAMUSSI, G.; MONTRUCCHIO, G.; LUPIA, M.; ARESE, M. & BUSSOLINO, F. (1996). Platelet-activating factor and angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **416**, 231-234.

52. CAMUSSI, G.; MONTRUCCHIO, G.; LUPIA, E.; DE MARTINO, A.; PERONA, L.; ARESE, M.; VERCELLONE, A.; TONIOLO, A. & BUSSOLINO, F. (1995). Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. *J. Immunol.*, **154**, 6492-6501.
53. CAMUSSI, G.; MONTRUCCHIO, G.; LUPIA, E.; SOLDI, R.; COMOGLIO, P.M. & BUSSOLINO, F. (1997). Angiogenesis induced in vivo by hepatocyte growth factor is mediated by platelet-activating factor synthesis from macrophages. *J Immunol.*, **158**(3), 1302-9
54. CAMUSSI, G.; TETTA, C. & BAGLIONI, C. (1990). The role of platelet-activating factor in inflammation. *Clin Immunol Immunopathol.* , **57**(3), 331-8.
55. CARMELIET, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.*, **6**(4),389-95.
56. CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, **9**(6), 653-660.
57. CARMELIET, P.; MOONS, L. & COLLEN, D. (1998). Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc. Res.*, **39**(1), 8-33.
58. CARRY, P.J.; PRESCOTT, D.M. & OGILVIE, G.K. (1979) Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. *Canc. Res.* **39**, 2139-2140.

59. CASALS-STENZEL, J.; MUACEVIC, G. & WEBER, K.H. (1987). Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther.*, **241**(3), 974-81.
60. CHAPLIN D. J. (1991) The effect of therapy on tumour vascular function. *Int. J. Rad. Biol.* **60**, 311-325.
61. CLERMONT, F.; ADAM, E.; DUMONT, J.E. & ROBAYE, B. (2003). Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha in primary cultured bovine endothelial cells. *Cell Signal.*, **15**(5), 539-46.
62. CONWAY, E. M.; COLLEN, D. & CARMELIET, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.*, **49**(3), 507-521.
63. CROSS, A. S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T. K.; DRYSDALE, B. E.; GRANGE, P. A.; CASSELS, F. J.; WANG, L. X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A. K.; KLEINBERG, M. & GOLDBLUM, S. E. (2003). Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J. Biolog. Chem.*, **278**(6), 4112-4120.
64. DAGLI, M. L. Z. (1989) Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental (dissertação de mestrado). *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia* 1-148.
65. DAMME, J. V. & MANTOVANI, A. (2005). From cytokines to

- chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**(6), 549-51.
66. D'AMORE, P.A. & THOMPSON, R.W. (1987). Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* , **49**, 453-464.
67. DELLIAN, M.; WITWER, B. P.; SALEHI, H. A.; YUAN, F. & JAIN, R. K. (1996). Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol.*, **149**(1), 59-71.
68. DENEKAMP, J. & HOBSON, B. (1982). Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer*, **46**(5), 711-720.
69. DENIZOT, Y.; CHIANEA, T.; LABROUSSE, F.; TRUFFINET, V.; DELAGE, M. & MATHONNET, M. (2005). Platelet-activating factor and human thyroid cancer. *European J. Endocrinol.*, **153**, 31-40.
70. DENIZOT, Y.; GAINANT, A.; GUGLIELMI, L.; BOUVIER, S.; CUBERTAFOND, P. & MATHONNET, M. (2003). Tissue concentrations of platelet-activating factor in colorectal carcinoma: inverse relationships with Dukes' stage of patients. *Oncogene*, **22**(46), 7222-4.
71. DRABKIN, D. L. & AUSTIN, J. H. (1935). II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **112**, 51-65.

72. DeVRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA N. & WILLIAMS, L.T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991.
73. DVORAK, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Eng. J. Med.*, **315**, 1650-1659.
74. DVORAK, H. F.; HARVEY, V. S.; ESTRELLA, P.; BROWN, L. F.; MCDONAGH, J. & DVORAK, A. M. (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.*, **57**(6), 673-86.
75. DVORAK, H.F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.P.; NAGY, J.A.; Van de WATER, L. & SENGER, D.R. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignants and inflammation. *Int. Arch. Allergy and Immunol.* **107**, 233-235.
76. ECCLES, S. A. & ALEXANDER, P. (1970) Macrophages content of tumor in relation to metastatic spread and host immune reactions. *Nature* **250**, 667-669.
77. EHRLICH, P. (1906). Experimentelle carcinomstudien na Mäusen. *Arb Inst Exp Ther Frankfurt*, **1**, 78-80.
78. ENHOLM, B.; PAAVONEN, K.; RISTIMAKI. A; KUMAR, V.; GUNJII, Y.; KLEFSTROM, J.; KIVINEN, L.; LAIHO, M.;

- OLOFSSON, B. JOUKOV, V.; ERIKSSON, U. & ALITALO, K. (1997). Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**, 2475-2483.
79. ESCHE, C.; STELLATO, C. & BECK, L.A. (2005). Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.*, **125**(4), 615-28.
80. FAN, T. -P. D. In vivo models of angiogenesis. In: Tumor angiogenesis. Eds. Bicknell, R.; Lewis, C.E. & Ferrara, N. Oxford University Press, Oxford, 1997.
81. FARACI, F. M. & SIGMUND, C. D. (1999). Vascular biology in genetically altered mice: smaller vessels, bigger insight. *Circ Res.*, **85**(12), 1214-1225.
82. FARIA NETO, H. C. C.; STAFFORINI, D. M.; PRESCOTT, S. M. & ZIMMERMAN, G. A. (2005). Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **100**(1): 83-91.
83. FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M. & JANCAR, S. (1990) Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* **14**, 125-132.
84. FELDMAN, M.; BRENNAN, F. M. & MAINI, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 397-440.

85. FERRARA, N. & ALITALO, K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med. Supl.* 1359-1364.
86. FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H.P.; NGYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J. & SCHWALL, R. H. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* **4**, 336-340.
87. FIERS, W. (1991). Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, celular and in vivo level. *FEBS Lett.* **285**, 199-212.
88. FOLKMAN, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, **285**, 1182-1186.
89. FOLKMAN, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.*, **1**, 27-31.
90. FOLKMAN, J. & BREM, H. (1992). Angiogenesis and inflammation. In: *Inflammation basic principles and clinical correlates*. 2th, New York: Raven Press, 821-839, 1992.
91. FORD, H. R.; HOFFMAN, R. A.; WING, E. J.; MAGEE, M.; MCINTYRE, L. & SIMMONS, R. (1989). Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch. Surg.*, **124**, 1422-1428.
92. FORM, D. M. & AUERBACH, R. (1983). PGE2 and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **172**(2), 214-218.

93. FRÀTER-SCHRÖDER, M.; RISAU, W.; HALLMANN, R.; GAUTSCHI, P. & BOHLEN, P. (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84**(15), 5277-5281.
94. GABRILOVICH, D.; ISHIDA, T.; OYAMA, T.; RAN, S.; KRAVTSOV, V.; NADAF, S. & CARBONE, D.P. (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the developmental of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, **92**(11), 4150-4166.
95. GERARD, C. & ROLLINS, B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol.*, **2**(2), 108-115.
96. GOBEIL, F. JR.; VAZQUEZ-TELLO, A.; MARRACHE, A. M.; BHATTACHARYA, M.; CHECCHIN, D.; BKAILY, G.; LACHAPPELLE, P.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. & CHEMTOB, S. (2003). Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors. *Can J Physiol Pharmacol.*, **81**(2), 196-204.
97. GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LÖHDEN, M.; CLAUS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMALER, K & SCHEURICH, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **83**, 793-802.
98. GRIFFIOEN, A. W. & MOLEMA, G. (2000). Angiogenesis:

- potentials for pharmacological intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 237-268.
99. GUERRA, J. L. (1983). Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. Tese de Doutorado. 1983. USP. São Paulo.
100. GUPTA, S. (2002). A decision between life and death during TNF- α - induced signaling. *J. Clin. Immunol.*, **22**(5), 185-194.
101. HADDOW A. (1972). Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing? *Adv Cancer Res.*, **16**, 181-234.
102. HARRIS, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.*, **2**(1), 38-47.
103. HASAN, J.; SHNYDER, S. D.; BIBBY, M.; DOUBLE, J. A.; BICKNELL, R. & JAYSON, G.C. (2004). Quantitative angiogenesis assays *in vivo* – a review. *Angiogenesis*, **7**, 1-16.
104. HATTARI, K.; HATTORI, M.; ADACHI, H.; TSUJIMOTO, M.; ARAI, H. & INONE, K. (1995). Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem.*, **270**(38), 22308-22313.
105. HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T. & DE BRUIJN, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.*,

- 56**(4), 549-80.
- 106.** HONDA, Z.; NAKAMURA, M.; MIKI, I.; MINAMI, M.; WATANABE, T.; SEYAMA, Y.; OKADO, H.; TOH, H.; ITO, K.; MIYAMOTO, T. & SHIMIZU, T. (1991). Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, **349**(6307), 342-6.
- 107.** HONG, K. H.; RYU, J. & HAN, K.H. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*, **105**, 1405-1407.
- 108.** HOSSNE, R. S. (2002). Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. *Acta Cir Brás*[on line], **17**(4),.
- 109.** HSU, S.; HUANG, F. & FRIEDMAN, E. (1995). Platelet-derived growth factor-B increases colon cancer cell growth in vivo by a paracrine effect. *J Cell Physiol*, **165**, 239-245.
- 110.** HU, D. E.; HILEY, C. R.; SMITHER, R. L.; GRESHAM, G. A. & FAN, T. P. (1995). Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. *Lab Invest.*, **72**(5), 601-10.
- 111.** IM, S-Y.; KO, H.M; KIM, J.W.; LEE, H.K.; HA, T.Y.; LEE, H.B.; OH, S.J.; BAI, S.; CHUNG, K.C.; LEE, Y.B.; KANG, H.S. & CHUN, S.B. (1996). Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. *Cancer Res.*, **56**(11), 2662-2665.

112. ISHII, S.; KUWAKI, T.; NAGASE, T.; MAKI, K.; TASHIRO, F.; SUNAGA, S.; CAO, W-H.; KUME, K.; FUKUCHI, Y.; IKUTA, K.; MIYAZAKI, J.; KUMADA, M. & SHIMIZU, T. (1998). Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J. Exp. Med.*, **187**(11): 1779-1788.
113. ISHII, S., NAGASE, T., TASHIRO, F., IKUTA, K., SATO, S., WAGA, I., KUME, K., MIYAZAKI, J. & SHIMIZU, T. (1997). Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *EMBO J.*, **16**, 133-142.
114. ISHII, S., NAKAMURA, M., WAGA, I., KUME, K., IZUMI, T. & SHIMIZU, T. (1997). Cloning and characterization of a murine platelet-activating factor receptor gene. *Adv Exp Biol.*, **407**, 347-55.
115. ISHII, S. & SHIMIZU, T. (2000). Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.*, **39**, 41-82.
116. JACKSON, J.R., BOLOGNESE, B., MANGAR, C.A., HUBBARD, W.C., MARSHALL, L.A. & WINKLER, J.D. (1998). The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **1392**, 145-152.
117. JACKSON, L. & EVERS, B.M. (2006). Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers. *Cancer Treatment*

and Research, **30**, 39-45.

118. JAIN, R. K. (1991). Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 253-266.
119. JAIN R.K. & BAXTER L.T. (1988) Mechanism of heterogenous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Canc. Res.* 48: 7022-7032.
120. JAIN, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.*, **9**, 685-693.
121. JAIN, R. K.; SCHLENGER, K.; HÖCKEL, M. & YUAN, F. (1997). Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat. Med.*, **3**(11), 1203-1207.
122. JANERO, D.R., BURGHARDT, C. (1990). Production and release of platelet-activating factor by the injured heart-muscle cell (cardiomyocyte). *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **67**(2), 202-218.
123. JIMENEZ, B.; VOLPERT, O.V.; CRAWFORD, S.E.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R.L. & BOUCK, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.*, **6**(1), 41-8.
124. KANAYASU, T., NAKAO-HAYASHI, J., ASUWA, N., MORITA, I., ISHII, T., ITO, H. & MUROTA, S. (1989). Leukotriene C4

stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro.. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **159**, 572-578.

125. KELNER, G. S.; KENNEDY, J.; BACON, K.B.; KLEYENSTEUBER, S.; LARGAESPADA, D. A.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; BAZAN, J. F.; MOORE, K. W.; SCHALL, T. J. , et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.*, **266**(5189), 1395-9.
126. KIM, C. D.; KIM, H. H.; KIM, Y. K.; KWAK, Y. K.; KIM, S.; YOO, S. & HONG, K. W. (2001). Antiangiogenic effect of KR31372 in rat sponge implant model. *J Pharmacol Exp Ther.*, **296**(3), 1085-90.
127. KODAMA, M. & KODAMA, T. (1975) Enhancing effect of hydrocortisone on hematogenous metastasis of Ehrlich ascites tumor in mice. *Cancer Res.* **35**, 1015-1021.
128. KRAWISZ, J. E.; SHARON, P. & STENSON, W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, **87**(6), 1344-50.
129. KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; SCHOEN, F.J. Robbins – Patologia estrutural e funcional. Ed. Elsevier. 7a ed, 2005.
130. KUME, K. & SHIMIZU, T. (1997). Platelet activating factor (PAF) induces growth stimulation, inhibition, and suppression of oncogenic transformation in NRK cells overexpressing the PAF receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22898.

131. KUNKEL, S. L.; LUKACS, N.; STRIETER, R. M. (1995). Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions Suppl.*, **46**, 11-22.
132. LAGE, A. P. & ANDRADE, S. P. (2000). Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by a fluorimetric method. *Microvasc. Res.*, **59**, 278-285.
133. LAURENZANA, A.; CELLAI, C.; VANNUCCHI, A. M.; PANCRACZZI, A.; ROMANELLI, M. N. & PAOLETTI, F. (2005). WEB-2086 and WEB-2170 trigger apoptosis in both ATR-sensitive and -resistant promyelocytic leukemia cells and greatly enhances ATRA differentiation potential. *Leukemia*, **193**, 90-95.
134. LEE, J.C.; CHOW, N.H.; WANG, S.T. & HUANG, S.M. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*, **36**, 748-753.
135. LEIBOVICH, S.J.; POLVERINI, P.J.; SHEPARD, H.M.; WISEMAN, D.M.; SHIVELY, V. & NUSEIR, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*, **329**(6140), 630-2.
136. LEUNG, D. W.; CACHIANES, G.; KUANG, W. J.; GOEDDEL, D. V. & FERRARA, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1601-1603.
137. LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E. & NEYTS, J. (2001) Angiogenesis:

- regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* **61**, 253-270.
- 138.** LIU, X. H.; EUN, B. L. & BARKS, J. D. E. (2001). Platelet-Activating Factor Antagonist BN 50730 Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Pediatr. Res.*, **49**, 804-811.
- 139.** LOCATI, M.; DEUSCHLE, U.; MASSARDI, M.L.; MARTINEZ, F.O.; SIRONI, M.; SOZZANI, S.; BARTFAI, T. & MANTOVANI, A. (2002). Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes. *J Immunol.*, **168**(7), 3557-62.
- 140.** LU, H.; MABILAT, C.; YEH, P.; GUITTON, J.D.; LI, H.; POUCHELET, M.; SHOEVAERT, D.; LEGRAND, Y.; SORIA, J. & SORIA, C. (1996). Blockage of urokinase receptor reduces in vitro the motility and the deformability of endothelial cells. *FEBS Lett.*, **380**(1-2), 21-4.
- 141.** MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K.A.; GRUNKEMEYER, J.A.; ERICKSEN, M.B.; HOPFER, H.; XIAO, Y.; STILLMAN, I.E. & KALLURI, R. (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem.*, **275**(28), 21340-8.
- 142.** MANNORI, G.; SANTORO, D.; CARTER, L.; CORLESS, C.; NELSON, R.M. & BEVILACQUA, M.P. (1997). Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol.*, **151**(1), 233-43

143. MANTOVANI, A.; SOZZANI, S. & INTRONA, M. (1997). Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci.*, **832**, 93-116.
144. MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P. & SICA, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TRENDS Immunol.*, **23**(11), 549-554.
145. MARRACHE, A. M.; GOBEIL, F. JR.; BERNIER, S. G.; STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; CHOUFANI, S.; BKAILY, G.; BOURDEAU, A.; SIROIS, M. G.; VAZQUEZ-TELLO, A.; FAN, L.; JOYAL, J. S.; FILEP, J. G.; VARMA, D. R.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. & CHEMTOB, S. (2002). Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol.*, **169**(11),6474-6481.
146. MATTSSON, W.; GYNNING, I.; TROPÉ, C. & ASTEDT, B. (1977) Chemoterapy of metastatic carcinoma of the breast. A 4-drug regimen. *Acta Rad.: Therap., Phys., Biol.* **16**, 97-108.
147. McINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A. & PRESCOTT, S. M. (1999). Biologically active oxidized phospholipids. *J Biol Chem.*, **274**(36), 25189-92.
148. McWILLIAMS, R.R. & ERLICHMAN, C. (2005). Novel therapeutics in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.*, **48**(8), 1632-1650.
149. MIOTLA, J.M.; JEFFERY, P.K. & HELLEWELL, P.G. (1998). Platelet

- activating factor play a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 197-204.
150. MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI, G. & CAMUSSI, G. (2000a). Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.*, **80**(4), 1669-99.
151. MONTRUCCHIO, G.; LUPIA, E. & BATTAGLIA, E. (2000b). Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **20**, 80-88.
152. MONTRUCCHIO, G.; LUPIA, E.; DE MARTINO, A.; SILVESTRO, L.; RIZEA SAVU, S.; CACACE, G.; DE FILIPPI, P. G.; EMANUELLI, G. & CAMUSSI, G. (1996). Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils. Involvement of platelet activating factor and P-Selectin. *Circulation*, **93**, 2152-2160.
153. MONTRUCCHIO, G.; SAPINO, A.; BUSSOLATI, B.; GHISOLFI, G.; RIZEA-SAVU, S.; SILVESTRO, L.; LUPIA, E. & CAMUSSI, G. (1998). Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. *Am J Pathol.*, **153**(5),1589-96.
154. MOORE B. B.; ARENBERG D. A.; ADDISON C. L.; KEANE M. P. & STRIETER R. M. (1998). Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J. Lab. Clin, Med.* **132**: 97-103.

155. MORAES S. P.; CUNHA, A.; REIS NETO, J. A.; BARBOSA, H. & DUARTE, R, F. (2000). Modelo experimental de tumor de Walker. *Acta Cir. Bras.* [on line] **15**(4).
156. MORO, L.; MARTINS, A. S.; ALVES, C. M.; SANTOS, F. G. A.; NUNES, J. E. S.; CARNEIRO, R. A.; CARVALHO, R. & VASCONCELOS, A. C. (2003). Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.*, **148**, 153-164.
157. MULLANE, K.M.; KRAEMER, R. & SMITH, B. (1985). Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Meth.*, **74**, 157-167.
158. MÜLLER, B. (2002). Cytokine imbalance in non-immunological disease. *Cytokine*, **18**, 334-339.
159. MURAKAMI, T.; CARDONES, A. R. & HWANG, S. T. (2004). Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci.* **36**(2), 71-8.
160. NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L. & MATRISIAN, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.*, **18**(5), 1135-49.
161. NGUYEN, M.; SHING, Y. & FOLKMAN, J. (1994). Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res*, **47**, 31-40.
162. NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A.; VOLIN, M. V.;

- GAMELLI, R. H. & Di PIETRO, L. A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.* **152**, 1445-1452.
- 163.** OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. (1992). Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. *Immunol Today.*, **13**(11), 463-4.
- 164.** O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, **88**(2), 277-85.
- 165.** OYAMA, TSUNEHIRO; RAN, S.; ISHIDA, T.; NADAF, S.; KERR, L.; CARBONE, D. P. & GABRILOVICH, D. I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.*, **160**(3), 1224-32.
- 166.** PALEOLOG, E. M.; DELASALLE, S. A.; BUURMAN, W. A. & FELDMANN, M. (1994). Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood.*, **84**(8), 2578-90.
- 167.** PASSANITI, A.; TAYLOR, R.M.; PILI, R.; GUO, Y.; LONG, P.V.; HANEY, J.A.; PAULY, R.R.; GRANT, D.S. & MARTIN, G.R. (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* **67**(4), 519-

528.

- 168.** PARRY, M. J.; ALABASTER, V. A.; CHEESEMAN, H. E.; COOPER, K.; DE SOUZA, R. N. & KEIR, R. F. (1994). Pharmacological profile of UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist with potent and prolonged oral activity. *J. Lipid Mediat. Cell Signal*, **10**(3), 251-268.
- 169.** PEASE, J. E. & WILLIAMS, T. J. (2006). The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *British J. Pharmacol.*, **147**(1), S212-S221.
- 170.** PEIRETTI, F.; CANAULT, M.; BERNOT, D.; BONARDO, B.; DEPRez-BEAUCLAIR, P.; JUHAN-VAGUE, I & NALBONE, G. (2005). Proteasome inhibition activates the transport and the ectodomain shedding of TNF- α receptors in human endothelial cells. *J. Cell Sci.*, **118**, 1061-1070.
- 171.** PITTON, C.; LANSON, M.; BESSON, P.; FETISSOFF, F.; LANSAC, J.; BENVENISTE, J. & BOUGNOUX, P. (1989). Presence of PAF-acether in human breast carcinoma: relation to axillary lymph node metastasis. *J. National Cancer Inst.*, **81**, 1298-1302
- 172.** PLUNKETT, M. L. & HAILEY, J. A. (1990). An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab. Invest.*, **62** (4), 510-517.
- 173.** POLVERINI, P. J. (1997). Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. *EXS.*, **79**, 11-28.

174. PONS, F.; ROSSI, A.G.; NORMAN, K.E.; WILLIAMS, T.J. & NOURSHARGH, S. (1993). Role of platelet-activating factor (PAF) in platelet accumulation in rabbit skin: effect of the novel long-acting PAF antagonist, UK 74505. *BR. J. PHARMACOL.* **109**(1): 234-242.
175. PREMACK, B. A. & SCHALL, T.J. (1996). Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat. Med.*, **2**, 1174-1178.
176. PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. & MCINTYRE, T. M. (1990). Platelet-activating factor. *J Biol Chem.*, **265**(29), 17381-4.
177. PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M. & MCINTYRE, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.*, **69**, 419-45.
178. REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, S.D. & REDMER, D.A. (1992). Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.*, **6**(3), 886-92.
179. RISAU, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
180. ROLLINS, B.J. (1997). Chemokines. *Blood.*, **90**(3), 909-28.
181. ROTH, M.; NAUCK, M.; YOUSEFI, S.; TAMM, M.; BLASER, K.; PERRUCHOUD, A.P. & SIMON, H.U. (1996). Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of

- interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *J Exp Med.*, **184**(1), 191-201.
- 182.** RUSSEL, S. W.; GILLESPIE, G. Y.; HANSEN, C. B. & COCHRANE, C. G. (1976) Inflammatory cells in solid murine neoplasms. II. Cell types found throughout the course of moloney sarcoma regression or progression. *Int. J. Cancer* **18**, 331-335.
- 183.** SALCEDO, R.; PONCE, M. L.; YOUNG, H. A.; WASSERMAN, K.; WARD, J. M.; KLEINMAN, H. K.; OPPENHEIM, J. J. & MURPHY, W. J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, **96**(1):34-40.
- 184.** SCAPINI, P.; NESI, L.; MORINI, M.; TANGHETTI, E.; BELLERI, M.; NOONAN, D.; PRESTA, M.; ALBINI, A. & CASSATELLA, M. A. (2002). Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J Immunol.*, **168**(11), 5798-804.
- 185.** SCHNEIDER, T. & ISSEKUTZ, A. C. (1996). Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol. Meth.*, **198**, 1-14.
- 186.** SEDGWICK, J. D.; RIMINTON, D. S.; CYSTER, J. G. & KÖRNER, H. (2000). Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol. Today*, **21**(3), 110-113.

187. SHERRY, B. & CERAMI, A. (1988). Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol.*, **107**(4), 1269-77.
188. SHIRAIISHI, A.; ISHIWATA, T.; SHOJI, T. & ASANO, G. (1995). Expression of PCNA, basic fibroblast growth factor, FGF-receptor and vascular endothelial growth factor in adenomas and carcinomas of human colon. *Acta Histochem Cytochem*, **28**, 21-29.
189. SICA, A.; SCHIOPPA, T.; MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European J. Cancer*, **42**, 717-727.
190. SNYDER, F.; LEE, T. C.; BLANK, M.; MALONE, B.; WOODARD, D. & ROBINSON, M. (1985). Platelet-activating factor: alternate pathways of biosynthesis, mechanism of inactivation, and reacylation of lyso-PAF with arachidonate. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, **15**:693-6.
191. SORENSEN, O. & BORREGAARD, N. (1999). Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. *J. Immunol. Meth.*, **232**, 179-190.
192. SOUZA, D. G.; CARA, D. C.; CASSALI, G. D.; COUTINHO, S. F.; SILVEIRA, M. R.; ANDRADE, S. P.; POOLE, S. P. & TEIXEIRA, M. M. (2000). Effects of PAF receptor antagonist UK 74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the

- superior mesenteric artery in the rat. *Brit. J. Pharmac.*, **131**, 1800-1808.
- 193.** SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. (1986). Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *J Clin Invest.*, **78**(2), 329-32.
- 194.** STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A. & PRESCOTT, S. M. (2003). Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, **40**(6), 643-72.
- 195.** STEPHEN, J. H. (2003). The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, **5**, S45-S57.
- 196.** STEWART, H. L. (1959). The cancer investigator. *Cancer Res.*, **19**, 804-818.
- 197.** STRIETER, R. M.; BELPERIO, J. A.; PHILLIPS, R. J. & KEANE, M. P. (2004). CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol.*, **14**(3):195-200.
- 198.** STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; ARENBERG, D. A.; BURDICK, M. D.; KASPER, J.; DZUIBA, J.; VAN DAMME, J.; WALTZ, A.; MARRIOT, D.; CHAN, S-Y.; ROCZNIAK, S. & SHANAFELT, A. B. (1995). The functional role of the ERL motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 27348-27357.
- 199.** SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T. &

- FUJIKURA, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.*, **132**(2), 345-352.
- 200.** SZEKANECZ, Z.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. & KOCH, A. E. (1998). Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.*, **20**(1-2), 115-32.
- 201.** TAKAHASHI, Y.; CLEARY, K.R.; MAI, M.; KITADAI, Y.; BUCANA, C.D. & ELLIS, L.M. (1996) Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin. Ca. Res.* **2**, 1679-1684.
- 202.** TAKAHASHI, Y.;KITADAI, Y.; BUCANA, C. D.; CLEARY, K. R. & ELLIS, L. M. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*, **55**, 3964-3968.
- 203.** TALMADGE, J. E.; KEY, M. & FIDLER, I. J. (1981) Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasms. *J. Immunol.* **126**, 2245-2248.
- 204.** TARTAGLIA, L. A. & GOEDDEL, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol. Today*, **13**, 151-153.
- 205.** TEIXEIRA, A. S.; CALIARI, M. V.; ROCHA, O. A.; MACHADO, R. D. & ANDRADE, S. P. (1999). Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. *Inflammation*, **23**(6),569-81.

- 206.** TEIXEIRA, M. M.; WELLS, T. N.; LUKACS, N. W.; PROUDFOOT, A. E.; UNKEL, S. L.; WILLIAMS, T. J. & HELLEWELL, P. G. (1997). Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. *J Clin Invest.*, **100**(7), 1657-66.
- 207.** TERASHITA, Z.; TSUSHIMA, S.; YOSHIOKA, Y.; NOMURA, H.; INADA, Y. & NISHIKAWA, K. (1983). CV-3988 - a specific antagonist of platelet activating factor (PAF). *Life Sci.*, **32**(17), 1975-82.
- 208.** TJOELKER, L. W.; WILDER, C.; EBERHARDT, C.; STAFFORINI, D. M.; DIETSCH, G.; SCHIMPF, B.; HOOPER, S.; LE TRONG, H.; COUSENS, L. S. & ZIMMERMAN, G. A. (1995). Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature*, **374**(6522), 549-53.
- 209.** TRIGGIANI, M. SCHLEIMER, R. P., WARNER, J. A. & CHILTON, F. H. (1991). Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells. *J. Immunol.*, **146**, 660-666.
- 210.** TSOPANOGLU, N. E., PIPILI-SYNETOS, E. & MARAGOUDAKIS, M. E. (1994). Leukotrienes C4 and D4 promote angiogenesis via a receptor-mediated interaction. *Eur. J. Pharmacol.*, **258**, 151-154.
- 211.** THORPE, P. E.; DERBYSHIRE, E. J.; ANDRADE, S. P.; PRESS, N.; KNOWLES, P. P.; KING, S.; WATSON, G. J.; YANG, Y. C. & RAO-BETTE, M. (1993). Heparin-steroid conjugates: new

- angiogenesis inhibitors with antitumor activity in mice. *Câncer Res.*, **53**(13), 3000-3007.
- 212.** VEIKKOLA, T. & ALITALO, K. (1999) VEGFs receptors and angiogenesis. *Semin. Canc. Biol.* **9**, 211-220.
- 213.** VENABLE, M. E.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M. & PRESCOTT, S. M. (1993). Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res.*, **34**(5), 691-702.
- 214.** VINCENT, L.; CHEN, W.; HONG, L.; MIRSHAHI, F.; MISHAL, Z.; MIRSHAHI-KHORASSANI, T.; VANNIER, J.P.; SORIA, J. & SORIA, C. (2001). Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett.*, **495**(3), 159-66.
- 215.** WAINSTEIN, A. (2001). A new mouse model for evaluating the immunotherapy of human colorectal cancer. *Cancer Res.*, **61**: 8520-8527.
- 216.** WAINSTEIN, A. J. A. Influência da radiação, mitomicina-C, solução hipotônica, hipertermia, BCG e interleucina-2 na evolução do tumor de Ehrlich intra-peritoneal em camundongos. (1999) 133f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas gerais.
- 217.** WANG, H. & CHAKRABARTY, S. (2003). Platelet-activating factor activates mitogen-activated protein kinases, inhibits proliferation, induces differentiation and suppresses the

- malignant phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene*, **22**(14), 2186-2196.
- 218.** WANG, H.; GORDON, D.; OLSZEWSKI, B.; SONG, Y. L.; KOVESDI, I. & KEISER, J. A. (2000). Rat sponge implant model: a new system for evaluating angiogenic gene transfer. *Int. J. Mol. Med.* **6**(6), 645-653.
- 219.** WARREN, B. A. (1979). TUMOR ANGIOGENESIS. In: Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors. Ed. Peterson, H -I., CRC Press, Florida p.49-75
- 220.** WILLIAMS, C. S.; TSUJII, M.; REESE, J.; DEY, S. K. & DUBOIS, R. N. (2000). Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.*, **105**, 1589-1594.
- 221.** WILSON, J. M.; COLETTA, P. L.; CUTHBERT, R. J.; SCOTT, N.; MACLENNANK, K.; HWCROFT, G.; LENG, L.; LUBETSKY, J. B.; JIN, K. K.; LOLIS, E.; MEDINA, F.; BRIEVA, J. A.; POULSOM, R.; MARKHAN, A. F.; BUCALA, R... & HULL, M. A. (2005). Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterol.*, **129**, 1485-1493.
- 222.** WOLLMAN, S. H. (1999) Summary of observations on transplantable tumors of the rat thyroid gland. *Biochemie.* **81**,409-412.
- 223.** WONG, M. P.; CHEUNG, N.; YUEN, S. T.; LEUNG, S. Y. & CHUNG, L. P. (1999). Vascular endothelial growth factor is up-

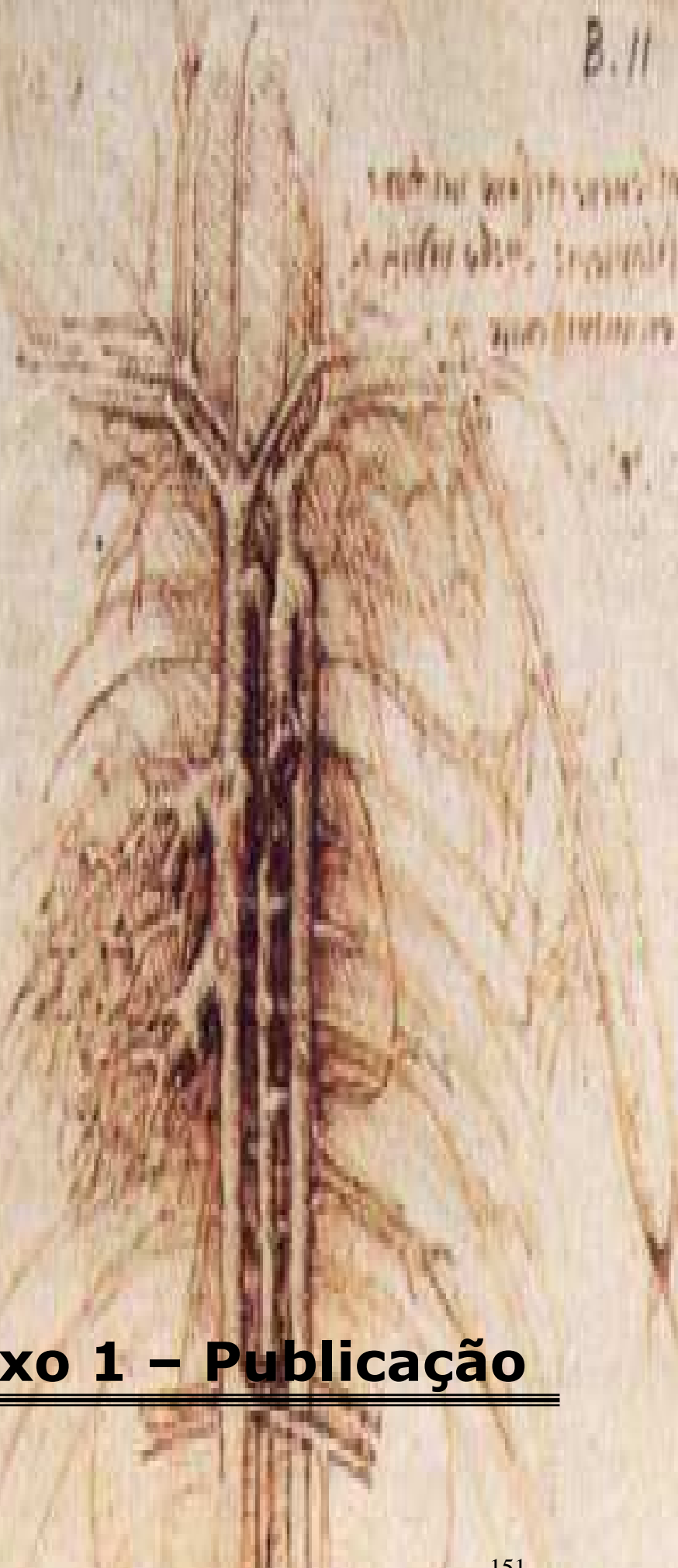
regulated in the pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer*, **81**, 845-850.

- 224.** YAMASHITA, J.; ITOH, H.; HIRASHIMA, M.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; YURUGI, T.; NAITO, M.; NAKAO, K. & NISHIKAWA, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, **408**(6808), 92-6.
- 225.** ZHIXING, P. K.; KRAVCHENKO, V. V. & YE, R. D. (1995). Platelet activating factor stimulates transcription of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in monocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7787-7790.
- 226.** ZIMMERMANN, N.; HERSHEY, G.K.; FOSTER, P. S. & ROTHENBERG, M. E. (2003). Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, 227-242.

B.11

Handwritten text in a script, possibly Indic, located on the left side of the page. It appears to be a list or a set of instructions, with some lines starting with a vertical line and a horizontal line.

Handwritten text in a script, possibly Indic, located on the right side of the page, above the main drawing.



Anexo 1 – Publicação

B.11

Anexo 2 – Editorial sobre a publicação
