

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

---

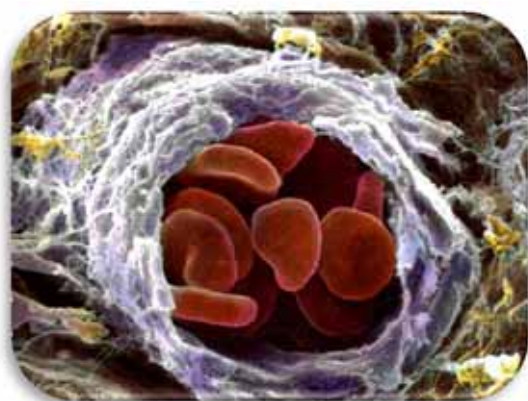
Jéssica Zani Lacerda

Investigação da ação da proteína anexina A1 sobre o processo de angiogênese induzido pelo fator de crescimento do endotélio vascular: modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

**Dissertação apresentada para obtenção  
do Título de Mestre em Genética.**

Jéssica Zani Lacerda

Investigação da ação da proteína anexina A1 sobre o processo de angiogênese induzido pelo fator de crescimento do endotélio vascular: modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto  
2015

Lacerda, Jéssica Zani.

Investigação da ação da proteína anexina A1 sobre o processo de angiogênese induzido pelo fator de crescimento do endotélio vascular : modelos experimentais in vivo e in vitro / Jéssica Zani Lacerda. -- São José do Rio Preto, 2015  
89 f. : il., tabs.

Orientador: Sonia Maria Oliani

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Proteínas angiogênicas. 3. Neovascularização. 4. Anexina A1. 5. Substâncias de crescimento. 6. Endotélio vascular.

I. Oliani, Sonia Maria. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

III. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Zani Lacerda

Investigação da ação da proteína anexina A1 sobre o processo de angiogênese induzido pelo fator de crescimento do endotélio vascular: modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

#### Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina Bonini Domingos  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janetti Nogueira de Francischi  
UFMG – Belo Horizonte

São José do Rio Preto  
24 de fevereiro de 2015

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Katia e Jaudir, pessoas que amo e admiro imensamente, que sempre se dedicaram a minha criação e confiaram em meus sonhos, me ensinando a acreditar que é possível realizá-los. Todas as minhas conquistas só foram realizadas devido a eles.*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani, meu reconhecimento pela competência, liderança, dedicação e sucesso. Meu agradecimento pela oportunidade, orientação e apoio durante todos os momentos. Aos seus ensinamentos, paciência e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2013/07487-2) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky pela doação da linhagem celular e colaboração na busca de desvendar a ação da proteína anexina A1 no processo estudado.

À Ma. Carine Cristiane Drewes pela amizade, competência, ensinamentos e ajuda na compreensão de todos os processos envolvidos.

Aos meus amigos Alexandre Dantas Gimenes, Caroline de Freitas Zanon, Laila Toniol Cardin, Marina de Paula Silva, Marystela Fávero de Oliveira Cardoso e Kallyne Kioko Oliveira Mimura, com quem compartilhei expectativas, angústias e conquistas em cada etapa desse trabalho.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Andréia Rodrigues de Moraes, Ana Paula Girol, Claudia Bosnich Mello, Cristiane Damas Gil, Deriane Elias Gomes, Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Frans Eberth Costa Andrade, Janesly Prates, Lucas Ribeiro Azevedo, Maysa Succi e Rafaela Batista Molás, uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.

À minha grande amiga Heloisa Trindade Moreira, pelo companheirismo, apoio, ajuda constante e carinho, que foram essenciais nesta etapa da minha vida.

Ao Felipe Sanches, por sempre estar ao meu lado, pelo carinho, compreensão, ajuda e por acreditar na minha capacidade.

À minha avó Ricardina Casaroto Zani, por estar ao meu lado me apoiando em todas as fases da minha vida. Não tenho palavras para descrever seu significado para mim.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram crédito ao meu trabalho.



*“Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir.  
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida  
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.  
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades  
para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.”*

(Clarice Lispector)

## RESUMO

**Introdução:** A proteína anexina A1 (ANXA1) está envolvida principalmente na regulação dos processos inflamatórios, proliferativos, crescimento e diferenciação celular. Embora esses efeitos tenham sido explorados em diversas investigações, são raros os estudos na angiogênese. A terapia angiogênica consiste no controle do crescimento vascular, e a descoberta da ação da proteína ANXA1 nesse processo resultaria no desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos. **Objetivo:** em função da importância do entendimento da ação reguladora da ANXA1 na formação de novos vasos, o objetivo das nossas investigações foi avaliar, *in vivo* e *in vitro*, o mecanismo de ação dessa proteína sobre a angiogênese, na vigência do fator de crescimento do endotélio vascular - subtipo A (VEGF-A). **Métodos:** Nas investigações *in vivo* avaliamos os efeitos da ANXA1 sobre a cinética de formação de novos vasos da rede microcirculatória da região dorsal da pele de camundongos BALB/c selvagens (WT) e destituídos do gene para ANXA1 (AnxA1<sup>-/-</sup>). Na linhagem de células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) investigamos o efeito da ANXA1 na viabilidade celular, proliferação, migração, formação de tubos, aderência e expressão de moléculas de adesão. **Resultados:** Os animais WT tratados com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg) ou VEGF e, os AnxA1<sup>-/-</sup> tratados com VEGF (10 ng/10 µL) apresentam aumento da neovascularização na pele. Nas células HUVEC, a análise da viabilidade não mostra diferenças significantes com ANXA1<sub>2-26</sub> nas concentrações de 1, 10 e 30 µM. Enquanto, a proliferação celular aumenta com o VEGF e/ou tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> (1 µM). No entanto, a migração celular aumenta após o tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> (10 µM) e, associado ao VEGF, nas concentrações de 10 e 30 µM. A tubulogênese aumenta após indução com VEGF e não altera após tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 µM). Diferentemente, VEGF associado com ANXA1<sub>2-26</sub> (10 µM) intensificam a formação das estruturas tubulares. O peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> aumenta a expressão da molécula de adesão β<sub>3</sub> integrina nas células endoteliais e, junto ao VEGF, aumenta VCAM-1, ICAM-1 e β<sub>3</sub> integrina. Entretanto, o peptídeo não altera a expressão de PECAM-1. Os ensaios de aderência celular mostram que o tratamento com VEGF aumenta esse processo nas células endoteliais ao

Matrigel<sup>®</sup>, enquanto VEGF e ANXA1<sub>2-26</sub>, em associação, inibem a aderência promovida somente pelo VEGF. **Conclusão:** Em conjunto, nossos dados indicam que a proteína ANXA1 participa do crescimento de novos vasos sanguíneos, podendo representar um avanço nas investigações terapêuticas relacionadas à angiogênese.

**Palavras-chave:** câmara dorsal cutânea, proteína anexina A1, fator de crescimento do endotélio vascular, célula endotelial de cordão umbilical humano, vasos sanguíneos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The annexin A1 protein (ANXA1) is mainly involved in the regulation of inflammation, proliferative, growth and cell differentiation. Although these effects have been studied in several investigations, are scarce the studies in angiogenesis. The angiogenic therapy consists in the vascular growth control, and the discovery of ANXA1 protein action in this process result in the development of new therapeutic procedures. **Aim:** According to the importance of understanding the ANXA1 regulatory action in the new vessels formation, the objective of our research was to evaluate *in vivo* and *in vitro*, the action mechanism of this protein on angiogenesis, in the presence of the growth factor vascular endothelial - subtype A (VEGF-A). **Methods:** *In vivo* investigations have evaluated the ANXA1 effects on the kinetics of formation of new vessels of microcirculatory network of dorsal skin of BALB/c wild (WT) and ANXA1 depleted (*AnxA1*<sup>-/-</sup>) mice. In endothelial cells from human umbilical vein lineage (HUVEC) investigated the effect of ANXA1 on cell viability, proliferation, migration, tube formation, cell adhesion and molecules adhesion expression. **Results:** The WT animals treated with peptide ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg) and VEGF and the *AnxA1*<sup>-/-</sup> animals treated with VEGF (10 ng/10  $\mu$ L) show an increase of neovascularization in the skin. In HUVEC cells, the viability analysis does not show significant differences with ANXA1<sub>2-26</sub> at concentrations of 1, 10 and 30  $\mu$ M. While, the cell proliferation increases with VEGF and/or ANXA1<sub>2-26</sub> treatments (1  $\mu$ M). However, cell migration increases after ANXA1<sub>2-26</sub> treatment (10  $\mu$ M) and, associated with VEGF, in concentrations of 10 and 30  $\mu$ M. The tubulogenesis increases after induction with VEGF and does not change after ANXA1<sub>2-26</sub> treatment (1, 10 or 30  $\mu$ M). In contrast, VEGF associated with ANXA1<sub>2-26</sub> (10  $\mu$ M) enhance the formation of tubular structures. The ANXA1<sub>2-26</sub> peptide increases the expression of  $\beta_3$  integrin adhesion molecule in endothelial cells and, together with VEGF increase VCAM-1, ICAM-1 and  $\beta_3$  integrin. Nevertheless, the peptide did not alter the expression of PECAM-1. Cell adherence assays show that treatment with VEGF increases this process at the endothelial cells to Matrigel<sup>®</sup>, whereas VEGF and ANXA1<sub>2-26</sub> together inhibit the adherence promoted only by VEGF. **Conclusion:** Taken together, our data

*indicate that ANXA1 protein participates of new blood vessels growth, which may represent an advance in therapeutic investigations related to angiogenesis.*

**Keywords:** *dorsal skinfold chamber, annexin A1 protein, growth factor vascular endothelial, endothelial cells from human umbilical cord, blood vessels.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos .....	24
<b>Figura 2.</b> Interações entre as moléculas de VEGF e seus receptores.....	29
<b>Figura 3.</b> Estrutura da proteína anexina A1 (ANXA1).....	31
<b>Figura 4.</b> Modelo experimental da câmara dorsal.....	38
<b>Figura 5.</b> Imagem representativa da região microcirculatória para a quantificação dos vasos sanguíneos.....	40
<b>Figura 6.</b> Imagens representativas dos efeitos dos tratamentos tópicos sobre a rede microcirculatória dos camundongos selvagens.....	48
<b>Figura 7.</b> Índice do número de vasos da microcirculação subcutânea dorsal dos camundongos selvagens .....	49
<b>Figura 8.</b> Imagens representativas do efeito do VEGF sobre a rede microcirculatória dos camundongos $AnxA1^{-/-}$ e índice do número de vasos ....	50
<b>Figura 9.</b> Efeitos dos tratamentos sobre a permeabilidade vascular .....	51
<b>Figura 10.</b> Efeitos do tratamento com o peptídeo ANXA1 <sub>2-26</sub> sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose das células endoteliais. ....	53
<b>Figura 11.</b> Histogramas obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais .....	54
<b>Figura 12.</b> Análises quantitativas da proliferação celular de células endoteliais .....	55
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias obtidas a partir de microscopia de luz da migração celular de células endoteliais .....	56
<b>Figura 14.</b> Efeitos do peptídeo ANXA1 <sub>2-26</sub> sobre a migração celular de células endoteliais.....	57

<b>Figura 15.</b> Efeitos do peptídeo ANXA1 <sub>2-26</sub> sobre a formação de tubos por células endoteliais. ....	59
<b>Figura 16.</b> Efeitos do peptídeo ANXA1 <sub>2-26</sub> sobre a aderência das células endoteliais ao Matrigel® .....	60
<b>Figura 17.</b> Efeitos do VEGF sobre a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 e $\beta_3$ integrina em células endoteliais por citometria de fluxo .....	61
<b>Figura 18.</b> Efeitos do peptídeo ANXA1 <sub>2-26</sub> sobre a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 e $\beta_3$ integrina em HUVEC por citometria de fluxo .....	63
<b>Figura 19.</b> Modelo que resume o mecanismo de ação da proteína ANXA1 nas células endoteliais durante o processo de angiogênese .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
±	Média
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
g	Grama
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mL	Mililitro
Nº	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
U	Unidade
X	Vezes
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANG-1</b>	Angiopietina-1
<b>ANXA1</b>	Anexina A1
<b>AnxA1<sup>-/-</sup></b>	Animais destituídos do gene para ANXA1



<b>ANXA1<sub>2-26</sub></b>	Peptídeo N-terminal da proteína anexina A1
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>COX-2</b>	Ciclo oxigenase-2
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblasto
<b>FITC</b>	Fluoróforo isotiocianato de fluoresceína
<b>HUVEC</b>	Célula endotelial de veia umbilical humana
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular-1
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>JAMs</b>	Moléculas de adesão juncionais
<b>KDa</b>	Quilodalton
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinase-2
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato de sódio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaqueta
<b>PE</b>	Molécula fluorescente ficoeretrina
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas-1
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>PIGF</b>	Fator de crescimento da placenta
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2

<b>RCF</b>	Força centrífuga relativa
<b>RT</b>	Transcriptase reversa
<b>S.E.M.</b>	<i>Standard error of the mean</i> = Erro padrão da média
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão celular vascular-1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular (subtipos A, B, C e D)
<b>VEGFR</b>	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (subtipos 1, 2 e 3).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. Formação de novos vasos sanguíneos: diferentes mecanismos .....	21
1.2. Angiogênese .....	21
1.3. Moléculas de adesão envolvidas na angiogênese .....	25
1.4. Regulação da angiogênese .....	28
1.5. Proteína anexina A1 .....	30
1.6. Proteína anexina A1 e angiogênese .....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1. Experimentos <i>in vivo</i> .....	37
3.1.1. Animais .....	37
3.1.2. Modelo experimental da câmara dorsal e protocolos de tratamentos .....	37
3.1.3. Avaliação da permeabilidade vascular .....	40
3.2. Experimentos <i>in vitro</i> .....	41
3.2.1. Cultivo da linhagem celular HUVEC .....	41
3.2.2. Tratamentos farmacológicos .....	41
3.2.3. Avaliação da viabilidade celular .....	42
3.2.4. Avaliação da proliferação celular .....	42
3.2.5. Avaliação da migração celular .....	43
3.2.6. Avaliação da formação de tubos .....	43
3.2.7. Avaliação da aderência celular .....	44
3.2.8. Avaliação da expressão de moléculas de adesão .....	44

3.3. Análises estatísticas .....	45
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
4.1. Experimentos <i>in vivo</i> .....	47
4.1.1. Efeito da proteína ANXA1 sobre os vasos da rede microcirculatória da pele de camundongos BALB/c selvagens e AnxA1 <sup>-/-</sup> .....	47
4.1.2. Efeitos dos tratamentos sobre a permeabilidade vascular da pele de camundongos BALB/c selvagens e AnxA1 <sup>-/-</sup> .....	51
4.2. Experimentos <i>in vitro</i> .....	52
4.2.1. Efeito da proteína ANXA1 sobre a viabilidade das células endoteliais .....	52
4.2.2 Efeito da ANXA1 sobre a proliferação de células endoteliais .....	55
4.2.3. Efeito da ANXA1 sobre a migração de células endoteliais .....	56
4.2.4. Efeito da ANXA1 sobre a formação de tubos pelas células endoteliais .....	58
4.2.5. Efeito da ANXA1 sobre a aderência de células endoteliais .....	60
4.2.6. Padronização do ensaio de avaliação da expressão das moléculas de adesão .....	61
4.2.7. Efeitos da ANXA1 sobre a expressão das moléculas de adesão em células endoteliais.....	62
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>86</b>
8.1. Anexo 1 .....	87
8.2. Anexo 2.....	88

## 1. INTRODUÇÃO

---

### **1.1. Formação de novos vasos sanguíneos: diferentes mecanismos**

A formação de novos vasos sanguíneos ocorre por meio de três mecanismos diferentes a saber: vasculogênese, arteriogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação de vasos a partir da diferenciação de precursores não diferenciados, responsável pela rede vascular durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, além de contribuir para a vascularização em alguns tipos de tecidos (KARAMYSHEVA, 2008). Sinais específicos provenientes de artérias e veias induzem a diferenciação de angioblastos (células precursoras endoteliais) que interagem com as células endoteliais e formam um labirinto vascular (CARMELIET; JAIN, 2011).

A arteriogênese é a maturação das anastomoses entre artérias por meio do recrutamento e revestimento dos vasos pré-formados com pericitos ou células musculares lisas, resultando no completo desenvolvimento de artérias funcionais (DEVEZA; CHOI; YANG, 2012).

A angiogênese é a formação de novos vasos a partir da rede vascular pré-existente, sendo fundamental em processos tais como: embriogênese, reparo e regeneração tecidual, cicatrizações, ciclo menstrual, estabelecimento e formação de massas tumorais, além de metástases de células neoplásicas (BERGERS; BENJAMIN, 2003; KARAMYSHEVA, 2008).

### **1.2. Angiogênese**

Esse processo envolve várias etapas e eventos celulares que culminam com a formação de novos vasos sanguíneos (STATON; REED; BROWN, 2009; YOO; KWON, 2013). A angiogênese apresenta um papel crucial em vários processos fisiológicos dentro do corpo humano, não somente no desenvolvimento fetal, mas também no reparo e regeneração tecidual, cicatrização de feridas e ciclo menstrual (YOO; KWON, 2013). Além disso, a desregulação da angiogênese está associada a várias patologias e pode ocorrer devido à insuficiência vascular ou crescimento excessivo de novos vasos sanguíneos (WANG, 2015). A terapia angiogênica é utilizada para controle desse processo e pode ser benéfica no tratamento de várias doenças (CARMELIET, 2003).

O processo de angiogênese envolve alterações das células endoteliais e do seu micro ambiente. Durante o processo, as células endoteliais adquirem características morfológicas heterogêneas quanto à morfologia, função e expressão gênica. Essas alterações são importantes para a liberação de enzimas que degradam a matriz extracelular, mudança da mobilidade e proliferação celular. Estudos têm demonstrado a importância do ajuste específico e coordenado do comportamento dessas células para que a formação dos novos vasos sanguíneos ocorra com êxito (HELLSTROM; PHNG; GERHARDT, 2007; LOBOV et al., 2007; SIEKMANN; LAWSON, 2007). Assim, a formação e o correto funcionamento da nova vasculatura necessitam de uma interação orquestrada entre células endoteliais, matriz extracelular e células circundantes (FAM et al., 2003).

As células endoteliais apresentam uma meia-vida longa e são protegidas pela ação autócrina de sinais que mantém seu funcionamento, tais como Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), ligantes *Notch*, angiopoietina-1 (ANG-1) e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Além disso, apresentam sensores de oxigênio e fatores induzidos por hipóxia que permitem ao vaso ajustar sua forma para otimizar o fluxo sanguíneo. Formam uma monocamada celular e se interconectam por moléculas juncionais. São envoltas por pericitos que liberam fatores de sobrevivência e controlam sua proliferação celular, além de apresentarem uma membrana basal em comum (CARMELIET; JAIN, 2011).

Existem dois tipos diferentes de células endoteliais: *tip cells* e *stalk cells*. A *tip cell* é a responsável por iniciar a angiogênese, apresentando caráter migratório e capacidade de detectar a presença de fatores angiogênicos. Em resposta a um sinal angiogênico, direciona sua migração, altera suas propriedades adesivas, induz a secreção de componentes que degradam a matriz extravascular, além de emitir filopódios para a formação dos capilares. Além disso, estão ligadas intimamente às *stalk cells* que se proliferam em resposta a fatores angiogênicos formando a extensão do novo vaso, estabilizando o novo lúmen e liberando moléculas para obterem informações espaciais sobre sua posição e das células vizinhas (GERHARDT et al., 2003; RUHRBERG et al., 2002; GEUDENS; GERHARDT, 2011).

A angiogênese é um processo altamente dinâmico e complexo, sendo caracterizado por uma sequência coordenada de eventos descrita abaixo e mostrada na Figura 1 (CARMELIET; JAIN, 2000; CARMELIET, 2000; BERGERS; BENJAMIN, 2003; YOO; KWON, 2013).

(1) Inicialmente, ocorre o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação dos capilares pré-existentes ou vênulas pós-capilares, em resposta a mediadores como o VEGF e óxido nítrico (NO);

(2) Remoção dos pericitos do endotélio dos vasos pré-existentes que posteriormente irão sofrer remodelação;

(3) Degradação da membrana basal e da matriz extracelular;

(4) Migração das células endoteliais para o espaço perivascular, em resposta a um gradiente de estímulo liberado pelo tumor ou células residentes, como por exemplo, o VEGF;

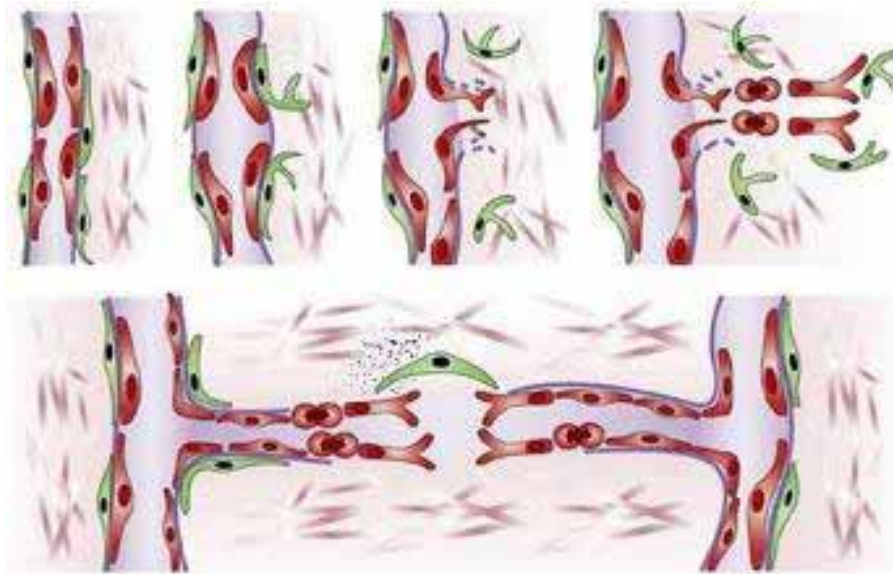
(5) Proliferação das células endoteliais;

(6) Migração das células endoteliais que recentemente proliferaram na matriz extracelular. Essa migração é organizada em forma de colunas, onde as células aderem uma às outras, criando um lúmen vascular;

(7) A formação do lúmen é acompanhada pelo estabelecimento e reforço das comunicações e contatos entre células endoteliais, formação da membrana basal, mobilização dos pericitos e das células musculares lisas para junto do endotélio;

(8) Amadurecimento do sistema e início da circulação sanguínea no novo vaso formado.





**Figura 1. Mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos.** Adaptado de BERGERS; BENJAMIN, 2003.

Quando sinais angiogênicos, como VEGF e NO, são liberados pelas células endoteliais constituintes dos vasos sanguíneos pré-existentes, os pericitos se destacam do endotélio e realizam a degradação proteolítica da membrana basal. As células endoteliais têm suas junções intercelulares enfraquecidas, culminando com a dilatação dos vasos. Outros fatores induzem o aumento da permeabilidade vascular, causando o extravasamento de proteínas do plasma sanguíneo. Após, ocorre a proteólise da matriz extracelular circundante e, em seguida, a sinalização pela integrina que induz a migração das células endoteliais para o espaço perivascular. Essas células passam a se proliferarem e a formar estruturas colunares (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A formação do lúmen vascular, também conhecido como processo de tubulogênese ou formação de tubos, é um evento crucial para a estabilidade dos novos vasos sanguíneos formados, permitindo o transporte de fluidos e componentes chave do sangue. Embora seja aceito que esse processo envolva o estabelecimento da polaridade apicobasal, interações com a matriz extracelular, e reorganização do citoesqueleto, os seus mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente estabelecidos (HOGAN; KOLODZIEJ, 2002; DATTA; BRYANT; MOSTOV, 2011). Estudos recentes indicam que uma

ampla gama de superfícies celulares e sinalização de proteínas estão envolvidas na tubulogênese (TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012).

Após a formação do lúmen vascular, ocorre o estabelecimento e reforço das comunicações e contatos entre as células endoteliais, formação da membrana basal, mobilização de pericitos e das células musculares lisas para junto do novo endotélio. O novo sistema formado é estabelecido e ocorre o início da circulação sanguínea na neovasculatura (CARMELIET; JAIN, 2011).

As últimas etapas da angiogênese consistem na formação da parede vascular e amadurecimento do novo vaso sanguíneo formado. Esses eventos são essenciais e limitam o processo, pois para um vaso sanguíneo ser estável, funcional e resistente à ruptura e deformação é necessário músculo liso, lâmina basal e pericitos. Caso não ocorram, a nova estrutura formada não é capaz de suportar a passagem do sangue (CARMELIET; JAIN, 2011).

As células da musculatura lisa apresentam a função fundamental de estabilizar os novos vasos formados, inibindo a migração e proliferação das células endoteliais (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). A matriz extracelular mantém o sistema vascular formado, permite o crescimento de novos vasos sanguíneos e armazena moléculas que são importantes vias de sinalização durante a angiogênese (ARROYO; IRUELA-ARISPE, 2010). Os pericitos, derivados de tecido embrionário mesenquimal, mantêm o tônus vascular, auxiliam na maturação e consolidação dos novos vasos sanguíneos e regulam a quiescência das células endoteliais (SAINSON; HARRIS, 2008; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). Além disso, os pericitos também interagem com as células endoteliais via moléculas de adesão, o que é importante para a estabilização dos vasos sanguíneos recém-formados (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

### **1.3. Moléculas de adesão envolvidas na angiogênese**

A formação de novos vasos requer a transição epitelial-mesenquimal das células endoteliais, que resultam em alterações acentuadas na sua morfologia, secreção e metabolismo como já salientado anteriormente (GHERSI, 2008). Um dos mecanismos importantes exercidos pela célula endotelial é a expressão de moléculas de adesão em suas membranas, que

medeiam a adesão homotípica e/ou heterotípica. Essas moléculas, na maioria das vezes são receptores glicoproteicos, constitutivamente expressos na membrana celular ou estocados em grânulos intracelulares ou, ainda, sintetizados frente à estimulação de diferentes origens, como substâncias químicas e alterações hemodinâmicas (GHERSI, 2008).

Na última década tem sido mostrado que a interação entre essas moléculas, além de promover a adesão celular, sinaliza eventos intracelulares necessários para manutenção da homeostasia ou progressão de processos patológicos. Membros da superfamília das imunoglobulinas, integrinas, caderinas e selectinas contribuem para cada fase da vascularização tumoral, não somente por mediar as interações célula-célula e célula-matriz, mas também por participar de eventos de sinalização que regulam a extensão e maturação de vasos recém-formados (NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010).

As principais moléculas de adesão envolvidas na angiogênese, que realizam a interação célula-célula, são as moléculas da superfamília das imunoglobulinas, PECAM-1 (molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas-1), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), além das JAMs (moléculas de adesão juncionais), E-selectina e N-caderinas (DEJANA, 2004; WEBER; FRAEMOHS; DEJANA, 2007; PARK et al., 2010). Dentre as moléculas de adesão envolvidas na interação célula-matriz está principalmente a  $\beta_3$  integrina (FRANCAVILLA; MADDALUNO; CAVALLARO, 2009; RAMJAUN; HODIVALA-DILKE, 2009; DESDROSELLIER; CHERESH, 2010).

A PECAM-1 é uma glicoproteína transmembrana, expressa na superfície das células endoteliais, plaquetas, células hematopoiéticas, algumas linhagens de linfócitos e tumores (TANG; CHEN, 1993; SHEIBANI; FRAZIER, 1999; ILAN; MADRI, 2003; NEWMAN; NEWMAN, 2003; LUTZKY; CARNEVALE, 2006). Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram a atuação dessa molécula no processo de angiogênese, sendo um modulador pró-angiogênico de células endoteliais. Foi observado que, em camundongos geneticamente deficientes de PECAM-1, a angiogênese foi reduzida no granuloma formado por um implante subcutâneo de membrana de polivinil (SOLOWIEJ et al., 2003; WOODFIN; VOISIN; NOURSHARGH, 2007). Além disso, a emissão de pseudópodes e

migração das células endoteliais suspensas em géis tridimensionais de colágeno, e a subsequente formação de tubos foi bloqueada pela incubação com anticorpos anti-PECAM-1 (DELISSER et al., 1997; KIM et al., 2001).

A VCAM-1 é uma proteína transmembrana, expressa em uma variedade de células, como endoteliais, dendríticas, epiteliais renais, leucócitos e macrófagos (BANKS et al., 1993; KWEEL et al., 1995). Essa molécula induz a motilidade de células endoteliais dependentemente de óxido nítrico (KEVIL et al., 2004). Além disso, apresenta influência na ocorrência de metástases, mediando a adesão entre células de melanoma (BANKS et al., 1993).

A ICAM-1 é uma glicoproteína transmembrana, expressa constitutivamente na membrana de células endoteliais e atua na mediação das ligações célula-célula. Além disso, essa molécula é expressa em uma variedade de outras células como fibroblastos, macrófagos e linfócitos, sendo sua expressão aumentada por estímulos inflamatórios (YANG; SHIMAOKA, 2004). Essa molécula atua na angiogênese promovendo a migração quimiotática e formação de tubos por células endoteliais (GHO; KLEINMAN; SOSNE, 1999), alterando a aderência das células endoteliais, ativando uma série de vias de sinalização intracelulares, desencadeando alterações no citoesqueleto de actina e consequente contratilidade da célula (LORENZON et al., 1998). Níveis elevados da ICAM-1 são observados associados ao processo de metástases (BANKS et al., 1993).

A  $\beta_3$  integrina participa principalmente das fases iniciais da angiogênese (FRANCAVILLA; MADDALUNO; CAVALLARO, 2009). Apresenta expressão em vasos sanguíneos tumorais, porém não em vasculatura quiescente e, sua expressão nas células endoteliais é estimulada por fatores de crescimento angiogênicos, como FGF-2, TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e IL-8 (interleucina-8) (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). Essa molécula de adesão interage com o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular-2 (VEGFR-2), alterando vias de transdução de sinais intracelulares, recrutando proteínas importantes para regiões promotoras desse receptor de fator de crescimento (MACDONALD et al., 2008). Além disso, também interage com o sítio proteolítico da metaloprotease-2 (MMP-2), aumenta a degradação da matriz extracelular e a migração das células endoteliais (DAVIS, 1992; BROOKS; CLARK; CHERESH, 1994), participa da regulação da COX-2 (ciclo

oxigenase-2) (DORMOND; LEJEUNE; RUEGG, 2002) e apresenta efeito citoprotetor em células endoteliais (WANG; MILNER, 2006).

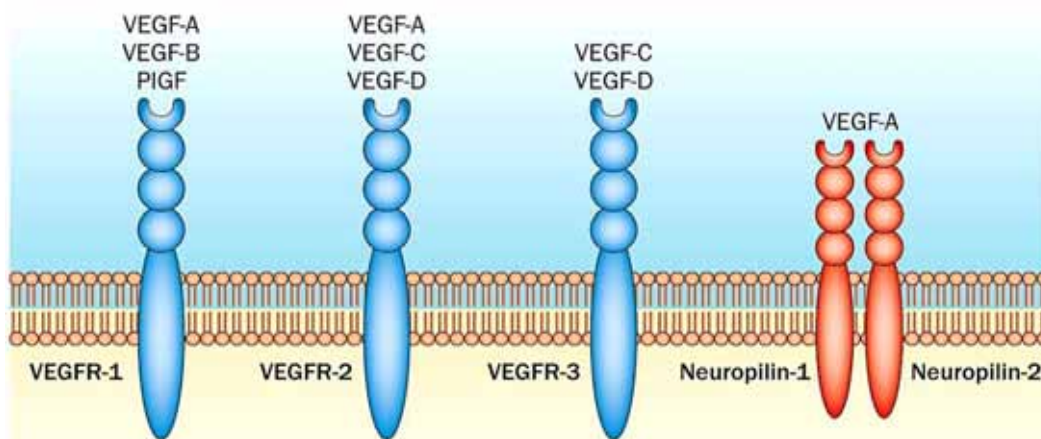
#### 1.4. Regulação da angiogênese

O processo de angiogênese é regulado pelo delicado balanço entre fatores pró-angiogênicos como VEGF, FGF, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), ácido lisofosfatídico (LPA), TNF- $\alpha$ , angiopoietinas, injúria, hipóxia e inflamação e, ainda, anti-angiogênicos como trombospondinas, estatinas (angiostatinas e endostatinas) e pericitos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; BERGERS; BENJAMIN, 2003). Quando os fatores anti-angiogênicos excedem os pró-angiogênicos não ocorre crescimento de novos vasos sanguíneos e, quando a maioria dos fatores são pró-angiogênicos, inicia-se o processo de formação de novos vasos sanguíneos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Assim, a indução da angiogênese depende de um desequilíbrio favorável dos fatores pró-angiogênicos (BERGERS; BENJAMIN, 2003; KARAMYSHEVA, 2008).

O VEGF é um dos mais potentes agentes angiogênicos, sendo um fator de sobrevivência para as células endoteliais, estimulando a origem de artérias, veias e vasos linfáticos (KARAMYSHEVA, 2008), mediando ações na célula endotelial em todas as etapas da angiogênese, embora com vias de sinalização intracelulares complexas e ainda não totalmente estabelecidas. A família VEGF em mamíferos é composta por cinco membros que apresentam uma estrutura homodímera: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PIGF (fator de crescimento da placenta). O VEGF-A apresenta cinco isoformas que são resultado de um *splicing* alternativo do VEGF-1 mRNA: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> (forma predominante), VEGF-A<sub>189</sub> e VEGF-A<sub>206</sub> (KARAMYSHEVA, 2008; CRAFTS, 2015).

Esses fatores de crescimento exercem seus efeitos biológicos por meio da interação com receptores tirosina quinase existentes nas membranas das células endoteliais que podem se apresentar em três diferentes subtipos: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (TAKAHASHI, 2011) (Figura 2). A ação biológica do VEGF-A e VEGF-B são mediadas por ligação ao VEGFR-1 e

VEGFR-2 e, a principal função, está relacionada ao desenvolvimento da neovascularização. O VEGF-B e VEGF-C ligam-se ao VEGFR-3 e estão associados com o desenvolvimento do sistema linfático (TAIMEH et al., 2013). A interação dos VEGFs com seus receptores permitem a ativação de vias intracelulares que resultarão no crescimento, proliferação, diferenciação e manutenção das células endoteliais constituintes dos vasos recém-formados (OLSSON et al., 2006). Os receptores neuropilin-1 e neuropilin-2, respondem ao estímulo VEGF, aumentam seletivamente a ligação do VEGF-A<sub>165</sub> ao receptor VEGFR-2, melhorando a transdução de sinais. Esse mecanismo pode explicar a maior potência do VEGF-A<sub>165</sub> em comparação com outras isoformas (TAIMEH et al., 2013).



**Figura 2. Interações entre as moléculas de VEGF e seus receptores.** Adaptado de TAIMEH et al., 2013.

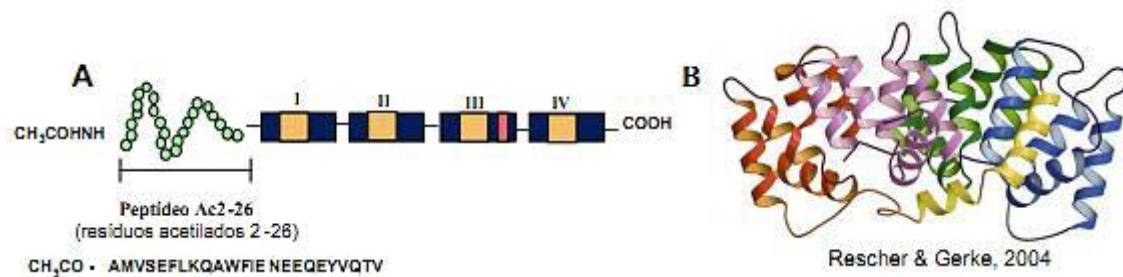
Ressaltamos que o processo de angiogênese é mediado por uma série de outros agentes químicos endógenos, mas o VEGF-A<sub>165</sub> foi o estímulo empregado no nosso estudo para esclarecer os mecanismos de ação da proteína anexina A1 (ANXA1) sobre a formação de novos vasos sanguíneos. O VEGF-A é um regulador chave no desenvolvimento da angiogênese, vasculogênese e diferenciação das células endoteliais progenitoras (TAKAHASHI, 2011).

## 1.5. Proteína anexina A1

Para um melhor entendimento do processo de angiogênese e sua regulação, algumas abordagens têm sido utilizadas na análise da expressão proteica e no papel regulatório da proteína anexina A1 (ANXA1) (YI; SCHNITZER, 2009). A ANXA1, antigamente designada lipocortina 1, é uma proteína de 37 KDa que apresenta sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolípídeos de membrana. Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados em mamíferos (RAYNAL; POLLARD, 1994) e, em humanos, o gene *ANXA1* está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2 (HOEHENWARTER et al., 1988).

Estruturalmente, as anexinas possuem dois domínios: uma pequena região N-terminal que varia em comprimento e composição, e um domínio central, formado por quatro a oito dobras repetidas, de uma sequência altamente conservada de 70 a 80 aminoácidos (MUNN; MUES, 1986; SARIS et al., 1986; LIM; PERVAIZ, 2007). A região convexa de cada repetição expressa dois sítios de ligação ao cálcio e faz face à membrana celular. A região côncava apresenta o domínio N-terminal e permanece livre para interagir com as proteínas citosólicas (RESCHER; GERKE, 2004).

O domínio N-terminal é único para cada membro da família, confere as atividades e funções específicas das anexinas e contém sítios para processos pós-traducionais, tais como, fosforilação, glicosilação e proteólise (PERRETTI; FLOWER, 2004; SOLITO et al., 2006; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Alguns trabalhos têm caracterizado a região N-terminal como promotora da ação anti-inflamatória da ANXA1, de modo que os resultados experimentais com o peptídeo sintético ANXA1<sub>2-26</sub>, contendo o mesmo sequenciamento de aminoácidos, confirmam a presença desse sítio ativo anti-inflamatório (PERRETTI, 1998; GAVINS et al., 2003; D'ACUNTO et al., 2014). Uma representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da ANXA1 são mostrados na Figura 3.



**Figura 3. Estrutura da proteína anexina A1 (ANXA1).** [A] Representação esquemática da estrutura primária da proteína anexina A1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub>). [B] Ilustração do arranjo tridimensional desta proteína (retirado de RESCHER; GERKE, 2004).

As proteínas da família das anexinas apresentam a habilidade de alterar a conformação durante a ligação aos cátions de cálcio (CIRINO; FLOWER, 1987; GOULDING et al., 1990; GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005). Na presença de concentrações de cálcio  $\geq$  a 1 mM, a ANXA1 é reestruturada, permitindo uma ligação fosfolipídica, em particular aos ácidos fosfolipídicos, por meio das regiões do domínio central (ROSENGARTH; GERKE; LUECKE, 2001). Essa interação ocorre concomitantemente ao rearranjo da região N-terminal, o que expõe seus aminoácidos ao ambiente extracelular e gera a forma ativa da proteína (ROSENGARTH; GERKE; LUECKE, 2001; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; D'ACQUISTO; PIRAS; RATTAZZI, 2013).

A ANXA1 é amplamente distribuída no organismo e pode ser encontrada constitutivamente em diversos tipos celulares como células endoteliais, epiteliais dos pulmões, intestinos, estômago, mama, rins e sinoviócitos (SAMPEY; HUTCHINSON; MORAND, 2000; ALLCOCK et al., 2001; OLIANI et al., 2001; OLIANI; PERRETTI, 2001; GIL et al., 2006; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; ARAUJO et al., 2012) e, também, em células estromais, como os fibroblastos (TAGOE et al., 2008). No entanto, a expressão da ANXA1 tem sido observada especialmente em células relacionadas aos processos de defesa (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005) como neutrófilos (PERRETTI et al., 2000; ALLCOCK et al., 2001; OLIANI et al., 2001; SOLITO et al., 2003), mastócitos (OLIANI et al., 2000; OLIANI et al., 2008), eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002), monócitos (GOULDING; LUYING; GUYRE, 1990;



SOLITO et al., 2001) e linfócitos (D'ACQUISTO et al., 2007; D'ACQUISTO et al., 2008).

Diversos estudos apontam diferenças na localização intracelular, como nas células endoteliais que expressam ANXA1 no núcleo, citoplasma e, particularmente, na membrana plasmática após interação com neutrófilos (OLIANI et al., 2001; GIL et al., 2006), mastócitos (OLIANI et al., 2000; SILISTINO-SOUZA et al., 2007) e eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002; SENA et al., 2006).

Estudos têm mostrado que a ANXA1 está envolvida na regulação da inflamação (GASTARDELO et al., 2009), apoptose (EL KEBIR; JÓZSEF; FILEP, 2008), crescimento (CÔTÉ et al., 2010) e diferenciação celular (BIZZARRO et al., 2010) e, ainda, no balanço entre angiogênese fisiológica e patológica, atuando como fator pró-angiogênico (YI; SCHNITZER, 2009).

Com base nesses dados, a proteína ANXA1 pode ser um importante fator regulatório do processo de angiogênese e a descoberta de seu mecanismo de ação poderá fornecer bases para procedimentos terapêuticos e tratamentos de várias doenças. Dessa forma, é de grande importância a indução da formação de novos vasos sanguíneos e a inibição dessa neovascularização.

### **1.6. Proteína anexina A1 e angiogênese**

Alguns resultados experimentais identificam a ANXA1 como reguladora da angiogênese, porém seu papel exato na fisiologia não está totalmente esclarecido e poucos estudos demonstram a ação dessa proteína nesse processo. Um estudo *in vivo* de Yi e Schnitzer (2009), utilizando modelo tumoral, mostrou que a ANXA1 é um regulador chave da angiogênese patológica e do balanço angiogênico fisiológico. Nesse modelo, a ANXA1 contribuiu para a formação de vasos sanguíneos e, animais deficientes para ANXA1 (AnxA1<sup>-/-</sup>), apresentaram diminuição do crescimento do tumor e ocorrências de metástases, aumento da sobrevivência do animal e necrose tumoral. Além disso, a cicatrização de feridas foi retardada em tecidos de animais AnxA1<sup>-/-</sup>.

Outro estudo *in vitro* de Pin e colaboradores (2012), utilizando células endoteliais HUVEC, mostrou que a ANXA1 é um importante regulador da migração celular e angiogênese, sendo essencial para a ocorrência desses processos junto ao VEGF. Anbalagan e colaboradores (2014) mostraram, em modelo de câncer de mama, que a ANXA1 ativa a via do NF- $\kappa$ B, resultando no aumento da cicatrização de feridas e formação de tubos, aumentando a ocorrência de metástase neste tipo de câncer.

Esses dados podem explicar a correlação entre a ANXA1 e o aumento do grau de invasividade e ocorrência de metástases no câncer de mama em modelo de hipóxia (OKANO et al., 2015). Okano e colaboradores mostraram que pacientes com elevada expressão dessa proteína apresentavam um pior prognóstico relacionado ao câncer de mama.

A regulação da angiogênese é importante para o tratamento de inúmeras doenças e consiste em uma área emergente da saúde denominada terapia angiogênica. A indução da angiogênese é extremamente necessária para o reparo de tecidos danificados, cicatrização de feridas, transplante e recuperação pós-isquemia (YI; SCHNITZER, 2009). Nesses casos, o crescimento de novos sistemas microvasculares é uma das maiores limitações e, dessa maneira, a intensificação do processo de angiogênese pode auxiliar no sucesso do tratamento (TSOPANOGLOU; MARAGOUDAKIS, 2007). Por outro lado, a inibição da angiogênese é um elemento chave para o tratamento de muitas doenças como câncer e retinopatias (KESISIS; BROXTERMAN; GIACCONE, 2007; COLE; JAYSON, 2008).

Dessa forma, tendo em vista a importância da proteína ANXA1, a descoberta exata de sua ação no processo fisiológico e patológico na angiogênese, pode resultar na descoberta de novos procedimentos terapêuticos.

## 2. OBJETIVOS

---

---

## 2.1. Objetivo geral

O objetivo do estudo foi verificar o efeito da proteína ANXA1 no processo de angiogênese induzido ou não pelo fator de crescimento VEGF-A em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

## 2.2. Objetivos específicos

### ***In vivo***

Em animais BALB/c selvagens e destituídos do gene para anexina A1 (AnxA1<sup>-/-</sup>) após instalação da câmara dorsal na pele, os seguintes tratamentos foram aplicados topicamente: PBS, VEGF e/ou ANXA1<sub>2-26</sub>. Nessas condições, avaliamos:

- i) a quantidade de vasos sanguíneos da rede microcirculatória após os tratamentos específicos.

### ***In vitro***

As células endoteliais da linhagem de veias umbilicais humanas (HUVEC) foram incubadas em placas de cultura na presença de PBS, VEGF e/ou ANXA1<sub>2-26</sub>. Nessas condições, avaliamos:

- i) viabilidade celular e a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1 e  $\beta_3$  integrina pela técnica de citometria de fluxo;
- ii) proliferação celular pelo *Countess*<sup>®</sup> *Automated Cell Counter*;
- iii) migração celular e tubulogênese por meio da microscopia de luz;
- iv) aderência celular por espectrofotometria.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

---

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto e, em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, coordenadora do Laboratório Toxicologia Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. O presente estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética em Pesquisa do IBILCE-UNESP (Pareceres: CEP 274.982 / CEUA 073/2013) (Anexos 1 e 2).

### **3.1. Experimentos *in vivo***

#### **3.1.1. Animais**

Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 20-25 g, com seis a oito semanas de vida, selvagens (WT) e destituídos do gene para anexina A1 (AnxA1<sup>-/-</sup>), foram provenientes do Laboratório de Toxicologia Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, SP. Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), e receberam água e ração *ad libitum*.

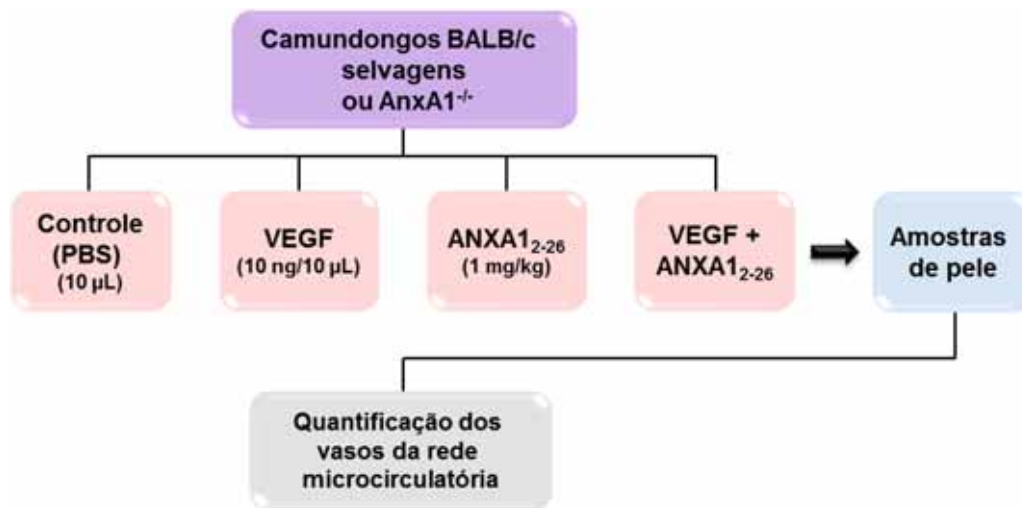
#### **3.1.2. Modelo experimental da câmara dorsal e protocolos de tratamentos**

Inicialmente, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina 2:1 mg/kg respectivamente, o tecido dorsal depilado com creme Veet<sup>®</sup> e, em seguida, as câmaras dorsais foram implantadas conforme descrito por Harder e colaboradores (2004) (Figura 4). Após depilação, a pele da região dorsal dos camundongos foi presa por fios de sutura, com o objetivo de permanecer completamente esticada. Inicialmente, a parte dorsal da câmara foi inserida e fixada com parafusos no tecido. Posteriormente, a parte frontal da pele foi retirada e, em seguida, a frontal da câmara fixada, permitindo assim uma visualização perfeita da microcirculação por meio do visor de vidro.



**Figura 4. Modelo experimental da câmara dorsal.** Imagens sequenciais do procedimento do implante da câmara dorsal para a análise da microcirculação da pele. Os camundongos foram depilados e a pele presa por fios de sutura. A parte dorsal da câmara foi inserida, fixada com parafusos no tecido e, posteriormente, a parte frontal da pele foi retirada e a frontal da câmara fixada.

Os tratamentos tiveram início no quarto dia após o procedimento do implante da câmara dorsal, sendo esse período necessário para a recuperação da inflamação local de pequena intensidade. Os animais foram inoculados topicamente (via de administração: instilação) no local da câmara dorsal com 10  $\mu$ L de PBS (solução tampão fosfato de sódio) (controle), 10 ng/10  $\mu$ L de VEGF (*Invitrogen*, UK) (DREWES et al., 2012) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (Ac-AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (*Chine Peptides*, CN) (RAYNAL; POLLARD, 1994) na dose de 1 mg/kg (GIROL et al., 2013), ambos diluídos em PBS. O esquema a seguir mostra o modelo experimental (n = 5 animais por grupo) e os protocolos dos tratamentos estão relacionados na Tabela 1.



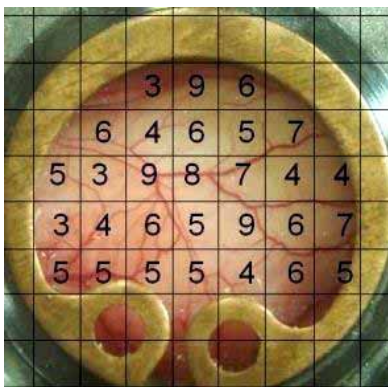
**Tabela 1.** Protocolo de tratamento com PBS, indução da angiogênese pelo VEGF e/ou tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub>.

Dia 01	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 09
Implante da câmara dorsal	Captura de imagens da câmara dorsal	Captura de imagens da câmara dorsal	Captura de imagens da câmara dorsal	Captura de imagens da câmara dorsal e eutanásia dos animais
	PBS (10 µL), VEGF (10 ng/ 10 µL) e/ou ANXA1 <sub>2-16</sub> (1 mg/kg)	PBS (10 µL), VEGF (10 ng/ 10 µL) e/ou ANXA1 <sub>2-16</sub> (1 mg/kg)	PBS (10 µL), VEGF (10 ng/ 10 µL) e/ou ANXA1 <sub>2-16</sub> (1 mg/kg)	

As imagens da rede microcirculatória, observadas na pele da região dorsal dos camundongos, foram obtidas em câmara fotográfica digital (Figura 5). A quantificação do número de vasos na rede microcirculatória foi realizada por meio das imagens capturadas nos dias 04 (antes dos tratamentos) e 09 (após os tratamentos), empregando uma malha digital que permite a padronização das dimensões das imagens e quantificação precisa dos números de vasos em cada segmento da malha (técnica adaptada de DELLIAN et al., 1996). As imagens obtidas por meio da câmera fotográfica digital foram ampliadas 200x e, posteriormente, quantificados o número de quadrados (preenchidos com 50% ou mais de área apta a ser contada) e o número de vasos presentes em cada quadrado. O índice de vasos de cada imagem foi obtido pelo cálculo seguinte: Índice = número de vasos nos



quadrados/ número de quadrados que apresentam vasos. Essa metodologia foi baseada no trabalho de Drewes (2011).



**Figura 5. Imagem representativa da região microcirculatória para a quantificação dos vasos sanguíneos.** Imagem representativa da microcirculação da pele da região dorsal dos camundongos e da malha digital para a quantificação dos vasos. Retirado de Drewes (2011).

### 3.1.3. Avaliação da permeabilidade vascular

O efeito dos tratamentos sobre a permeabilidade vascular foi estudado de acordo com o modelo estabelecido por Senger e colaboradores (1990). Inicialmente os animais ( $n = 4$  animais por grupo) foram anestesiados com ketamina/xilazina 2:1 mg/kg respectivamente e o tecido dorsal depilado com creme Veet<sup>®</sup>. Em seguida, as áreas utilizadas para mensuração do extravasamento vascular foram marcadas no dorso do animal (7 sítios diferentes). Foi aplicada uma injeção intravenosa via plexo retro-orbital de 200  $\mu$ L do corante Azul de Evans (10 mg/kg). Imediatamente após a injeção do corante, foram aplicadas injeções intradérmicas de PBS (10  $\mu$ L), VEGF (100 ng/20  $\mu$ L), VEGF (10 ng/10  $\mu$ L), ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg), ANXA1<sub>2-26</sub> (0,1 mg/kg), ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg) + VEGF (10 ng/10  $\mu$ L) e ANXA1<sub>2-26</sub> (0,1 mg/kg) + VEGF (10 ng/10  $\mu$ L). Após 1 hora, os animais foram sacrificados e as peles retiradas exatamente nos locais das aplicações dos mediadores. Essas foram imersas separadamente em formamida, por 24 horas, e a quantidade do corante mensurada por espectrofotometria. Os valores de absorbância foram aferidos

fazendo a leitura teste no comprimento de onda de 620 nm e a leitura de referência no comprimento de onda 690 nm (DO = DO 620 nm – DO 690 nm).

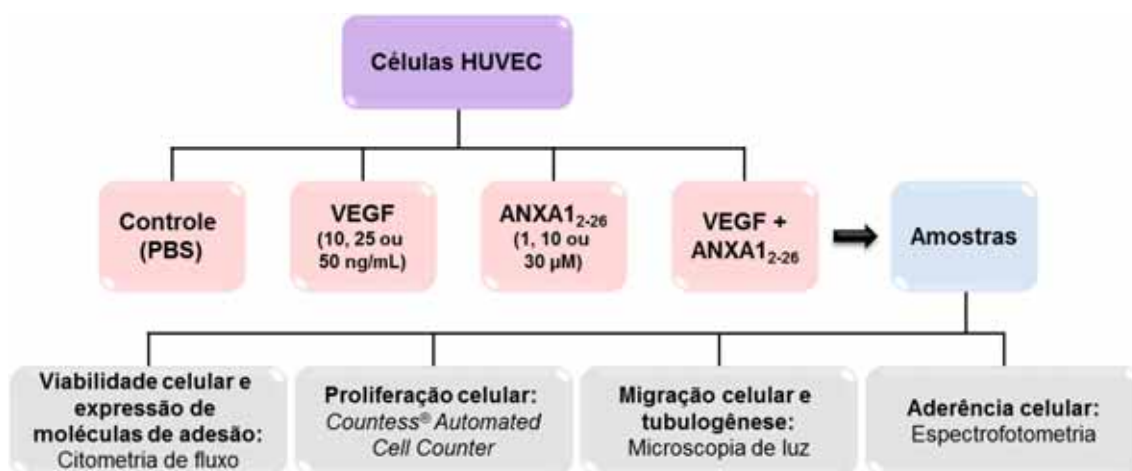
### **3.2. Experimentos *in vitro***

#### **3.2.1. Cultivo da linhagem celular HUVEC**

A linhagem de células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) (*American Type Culture Collection* - ATCC<sup>®</sup> - CRL-2873<sup>™</sup>) que reúne as melhores condições técnicas para o desenvolvimento desse estudo, foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Sandra H. P. Farsky da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, SP. Essas células permaneceram em Dimetil sulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Br) a -80°C até o momento de uso. Foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (*Invitrogen*, UK) suplementado com 10% de SFB, 200 mM de L-glutamina, 0,1 mg/mL de streptomina e 100 U/mL de penicilina (Cultilab, Br), sendo mantidas em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente no microscópio de luz invertido e, quando obtivemos uma densidade celular alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em duas réplicas.

#### **3.2.2. Tratamentos farmacológicos**

As células HUVEC foram cultivadas em meio completo como descrito no item anterior, expostas ao PBS no grupo controle, induzidas pelo VEGF (10, 25 ou 50 ng/mL) (*Invitrogen*, UK) (DREWES et al., 2012) e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 μM) (*Chine Peptides*, CN), ambos diluídos em PBS. As diferentes condições experimentais e metodologias realizadas estão apresentadas no esquema a seguir:



### 3.2.3. Avaliação da viabilidade celular

As células foram cultivadas ( $1 \times 10^5$  células/poço) e, após a aderência à placa de cultura, incubadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas com os seguintes tratamentos: meio de cultura na presença de PBS (controle) ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu$ M). Após o período necessário das incubações, o sobrenadante das células foi recolhido e as células tripsinizadas. Essas células foram centrifugadas por 10 minutos a 600 RCF, a 10°C e, após o sobrenadante descartado, foi adicionado 100  $\mu$ L de anexina-V (conjugada com o fluorocromo FITC (Fluoróforo isoticianato de fluoresceína) e diluída com tampão de ligação para anexina (1:100)) e mantidos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após 20 minutos, foi adicionado 10  $\mu$ L de PI (iodeto de propídio, na concentração de 50  $\mu$ g/mL). Os tubos de citometria foram analisados imediatamente pelo citômetro de fluxo *FACS Canto* (Becton Dickinson, USA) e avaliados usando o *software Flow Jo* (versão 9.1) no Laboratório Toxicologia Experimental, USP, SP. Os dados de 10.000 células foram obtidos e, somente as morfologicamente viáveis foram consideradas para análise.

### 3.2.4. Avaliação da proliferação celular

O crescimento celular foi avaliado diariamente no microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* (Olympus, JP) do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP. Para análise do índice de proliferação celular foi realizada uma curva de crescimento das células cultivadas em

---

---

placas de cultura. As células foram cultivadas ( $1 \times 10^5$  células/poço) e, após a aderência à placa de cultura, foram incubadas com PBS (controle), VEGF (10 ng/mL) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1  $\mu$ M). Posteriormente, foram tripsinizadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas e quantificadas no contador de células *Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter* (Invitrogen, UK) do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP.

### 3.2.5. Avaliação da migração celular

As células foram cultivadas e, após a aderência à placa de cultura ( $5 \times 10^4$  células/poço) e alcance de confluência de 90%, foi realizado um risco ou ferida no centro dos poços com uma pipeta de 200  $\mu$ L. Posteriormente, as células foram lavadas suavemente, incubadas com PBS (controle), VEGF (50 ng/mL) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu$ M) durante o período de 0, 6 e 12 horas. A migração celular foi monitorada com imagens obtidas antes e após os tratamentos (aumento 40x), usando uma câmera *Olympus DP73* (Olympus, JP) acoplada ao microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* (Olympus, JP). Os números de núcleos celulares, que atravessarem o risco, foram determinados em três campos microscópicos diferentes e, posteriormente, quantificados.

### 3.2.6. Avaliação da formação de tubos

Inicialmente, o Matrigel<sup>®</sup> (Spectrun, Br) foi diluído 1:2 vezes com meio de cultura e 250  $\mu$ L dessa solução foi plaqueada para os poços de uma placa de cultura de 24 poços. A placa de cultura foi incubada por 1 hora, a 37°C, para permitir a polimerização do Matrigel<sup>®</sup>. Posteriormente, as células foram adicionadas ( $8 \times 10^4$  células/poço) na presença dos tratamentos PBS (controle), VEGF (50 ng/mL) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu$ M), totalizando 400  $\mu$ L por poço, sobre o Matrigel<sup>®</sup>. As células foram incubadas com os tratamentos por 24 horas e, ao término da incubação, três campos diferentes de cada poço foram fotografadas (aumento de 40x) e as imagens foram utilizadas para a quantificação das estruturas tubulares. A formação dos tubos foi calculada em relação ao grupo controle, que foi considerado como 100%.

### 3.2.7. Avaliação da aderência celular

As células foram cultivadas ( $2 \times 10^5$  células/poço) e, após a aderência à placa de cultura, incubadas com os seguintes tratamentos: meio de cultura tratado com PBS (controle), VEGF (50 ng/mL) (DREWES et al., 2012) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu$ M). Após 2 horas, as células foram removidas com o auxílio de *cell scraper*, centrifugadas e quantificadas. As células foram adicionadas a uma placa de 96 poços contendo Matrigel<sup>®</sup> e incubadas por 30 minutos, a 37°C. O Matrigel<sup>®</sup> foi previamente plaqueado, sendo 50  $\mu$ L por poço, e polimerizado durante 1 hora a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com PBS, a 37°C. Foram adicionados 100  $\mu$ L de corante cristal violeta a 0,1% por poço, 10 minutos à temperatura ambiente. O corante cristal violeta foi aspirado cuidadosamente e cada poço lavado dez vezes com PBS, a 37°C. Foi adicionado 100  $\mu$ L de ácido acético a 50% (diluído em água deionizada) em cada poço. Posteriormente, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro, do Laboratório Toxicologia Experimental, USP, SP, nos comprimentos de onda de 580 e 690 nm. Os resultados foram obtidos de acordo com a diferença das densidades ópticas nas leituras nos diferentes comprimentos de onda. As células endoteliais aderidas ao Matrigel<sup>®</sup> internalizam o corante cristal violeta pelo processo de pinocitose e o ácido acético provoca ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático da células. Assim, essa solução é lida e quantificada pelo espectrofotômetro.

### 3.2.8. Avaliação da expressão de moléculas de adesão

As células foram cultivadas ( $5 \times 10^5$  células/poço) e, após a aderência à placa de cultura, incubadas com os seguintes tratamentos: meio de cultura tratado com PBS (controle), VEGF (10, 25 ou 50 ng/mL) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (30  $\mu$ M). Após 4 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril a 37°C, removidas com o auxílio de um *cell scraper*, colocadas em tubos de citometria de fluxo, e centrifugadas por 10 minutos, a 600 RCF, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células de cada tubo de citometria foram

incubadas com os anticorpos anti-PECAM-1 (CD31), anti-ICAM-1 (CD54), anti-VCAM-1 (CD106) ou anti- $\beta_3$  integrina (CD61). Os anticorpos anti-PECAM-1, anti-ICAM-1 estavam conjugados com a molécula fluorescente ficoeretrina (PE) e os anticorpos anti-VCAM-1 e anti- $\beta_3$  integrina, com a molécula fluorescente FITC. As células foram incubadas com os anticorpos por 20 minutos, a 4°C, protegidos da luz. Em seguida, as células foram fixadas com 200  $\mu$ L de paraformaldeído a 2%, analisadas pelo citômetro de fluxo FACS Canto (*Becton Dickinson*, USA) e avaliadas por meio do *software Flow Jo* (versão 9.1) do Laboratório Toxicologia Experimental, USP, SP. Os dados de 10.000 células foram obtidos e, somente as células morfologicamente viáveis, foram consideradas para análise.

### **3.3. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) e analisados estatisticamente pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de *Bonferroni* e *t* de *Student*, quando necessário. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O programa *GraphPad Prisma*<sup>®</sup> versão 5.00 foi utilizado para conduzir as análises estatísticas.

## 4. RESULTADOS

---

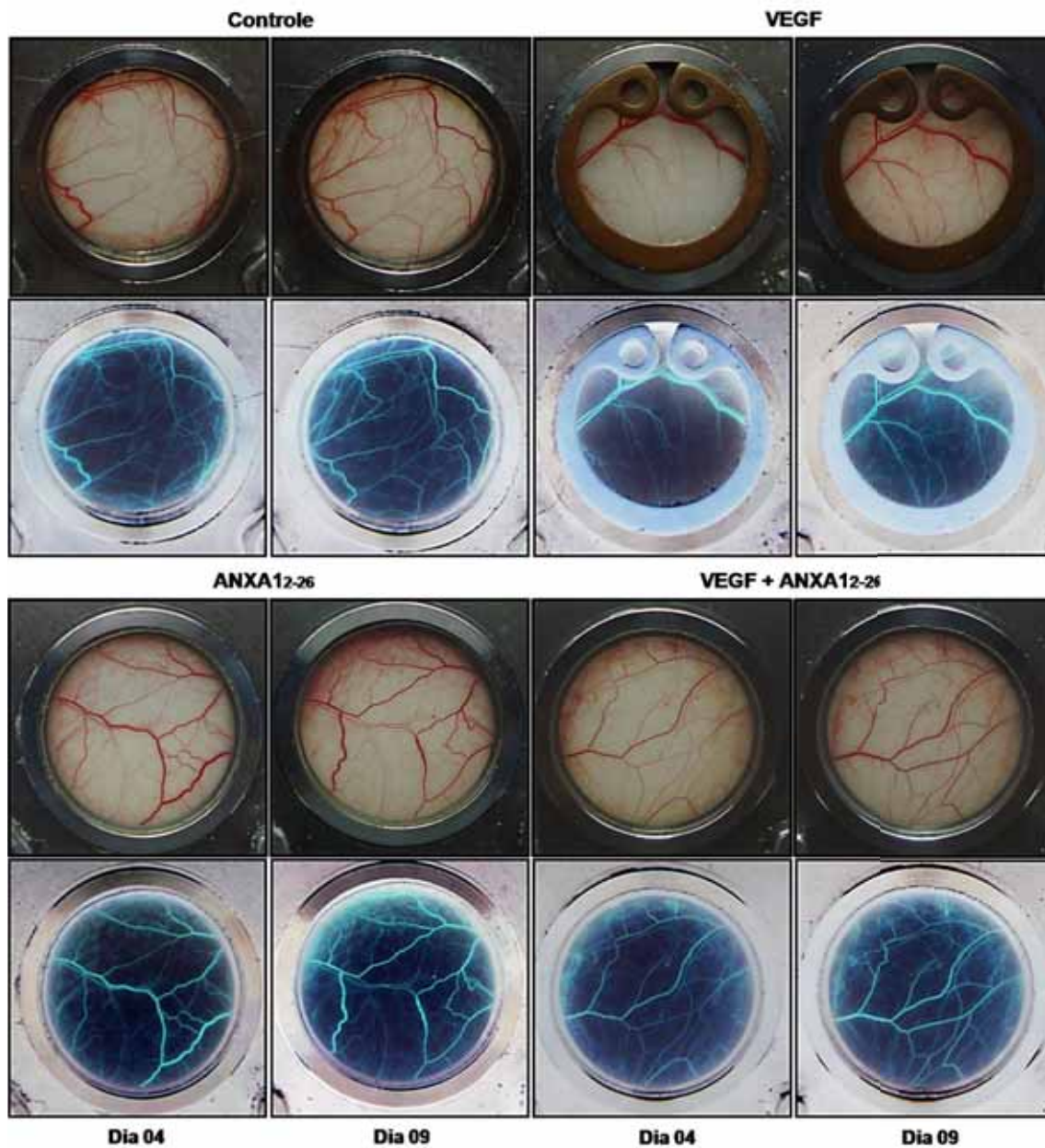
---

#### **4.1. Experimentos *in vivo***

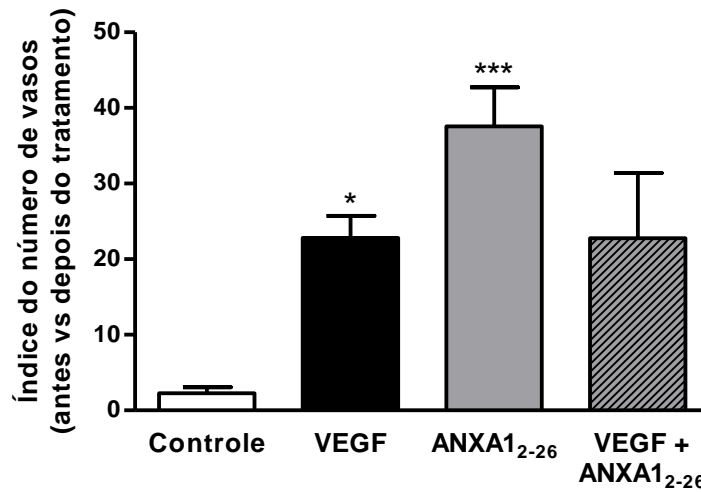
##### **4.1.1. Efeito da proteína ANXA1 sobre os vasos da rede microcirculatória da pele de camundongos BALB/c selvagens e AnxA1<sup>-/-</sup>**

Os animais selvagens foram tratados com PBS (controle), VEGF (10 ng/10 µL) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg) a cada 24 horas, totalizando três administrações de cada tratamento. As imagens capturadas, a cada 24 horas, mostram que o tratamento somente com VEGF ou ANXA1<sub>2-26</sub> aumenta o número de vasos sanguíneos recém-formados em relação aos controles (Figuras 6 e 7). Enquanto, os animais AnxA1<sup>-/-</sup> tratados com PBS (controle) e VEGF (10 ng/10 µL), a cada 24 horas, totalizando também três administrações de cada tratamento, mostram que o tratamento com VEGF aumenta o número de vasos sanguíneos recém-formados em relação aos controles (Figuras 8 A e B).

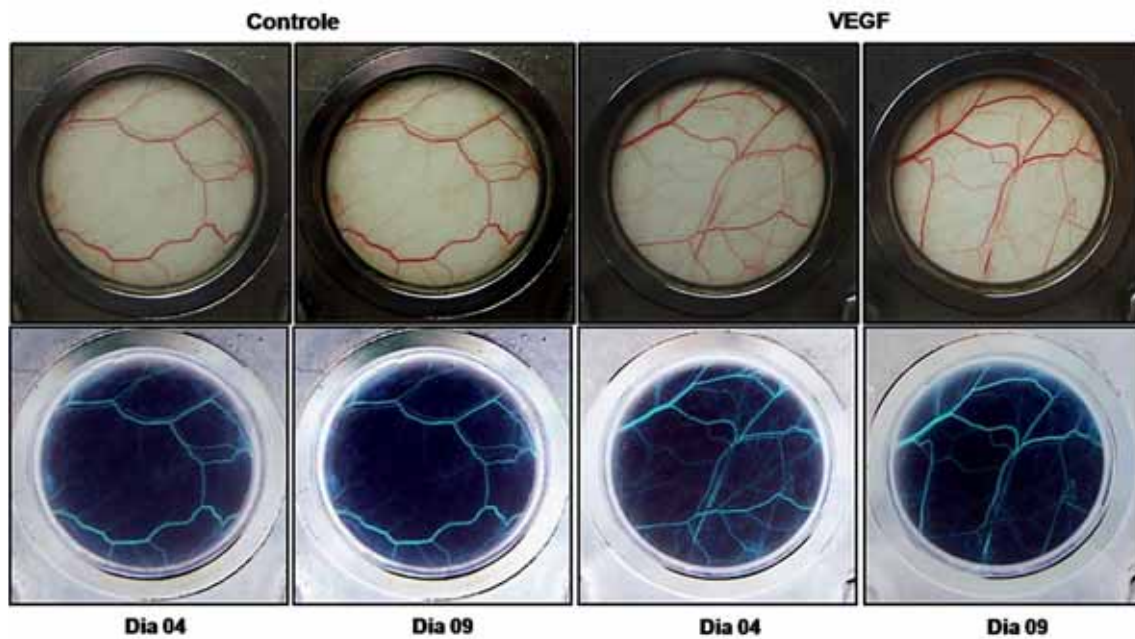




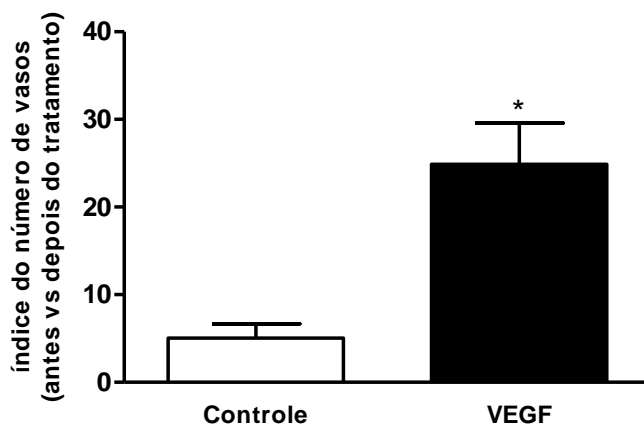
**Figura 6.** Imagens representativas dos efeitos dos tratamentos tópicos sobre a rede microcirculatória dos camundongos selvagens. As imagens foram capturadas por câmera digital (dia 04) e após tratamentos com PBS (10  $\mu$ L), VEGF (10 ng/10  $\mu$ L) e/ou ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg) (dia 09). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e, da inferior, são as mesmas imagens obtidas após a inversão computacional das cores.



**Figura 7. Índice do número de vasos da microcirculação subcutânea dorsal dos camundongos selvagens.** Efeitos após tratamentos tópicos com PBS (controle), VEGF (10 ng/ 10  $\mu$ L) e/ou peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg). As imagens da rede microcirculatória foram obtidas no dia 04 e após tratamentos com PBS (10  $\mu$ L), VEGF (10 ng/10  $\mu$ L) e/ou ANXA1<sub>2-26</sub> (1 mg/kg), no dia 09. Os valores expressam a média  $\pm$  S.E.M. de 5 animais por grupo (n = 5). \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  versus controle.



A

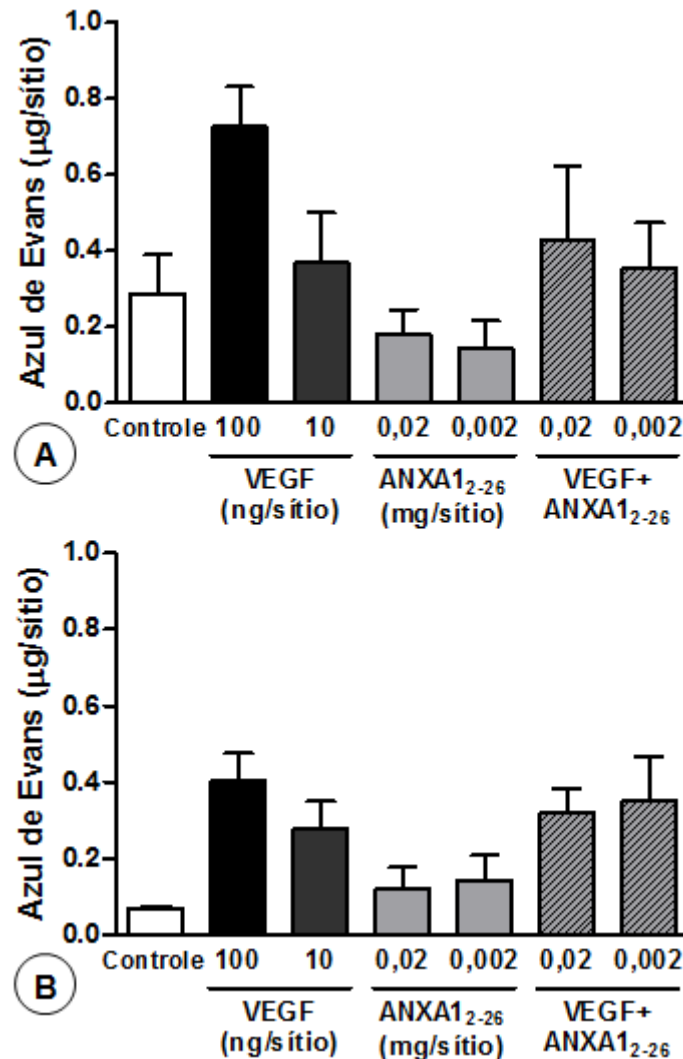


B

**Figura 8.** Imagens representativas do efeito do VEGF sobre a rede microcirculatória dos camundongos  $AnxA1^{-/-}$  e índice do número de vasos. **[A]** Imagens foram capturadas por câmera digital (dia 04) e após tratamentos com PBS (10  $\mu$ L) e/ou VEGF (10 ng/10  $\mu$ L) (dia 09). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e, da inferior, são as mesmas imagens obtidas após a inversão computacional das cores. **[B]** Índice expressa o número de vasos da microcirculação subcutânea dorsal após tratamentos. Os valores expressam a média  $\pm$  S.E.M. de 5 animais por grupo (n = 5). \*  $p < 0,05$  versus controle.

#### 4.1.2. Efeitos dos tratamentos sobre a permeabilidade vascular da pele de camundongos BALB/c selvagens e $Anx1^{-/-}$

Os resultados mostram que o tratamento com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub>, em animais selvagens ou  $Anx1^{-/-}$ , não altera a permeabilidade vascular nas condições basais ou na vigência do estímulo VEGF (Figuras 9 A e B).



**Figura 9. Efeitos dos tratamentos sobre a permeabilidade vascular.** Animais selvagens [A] e  $Anx1^{-/-}$  [B] foram submetidos a injeções intravenosas do corante Azul de Evans e intradérmicas dos tratamentos PBS, VEGF e/ou ANXA1<sub>2-26</sub>. O efeito dos tratamentos, sobre o processo de permeabilidade vascular, foi mensurado pela quantificação do corante extravasado pela espectrofotometria. Os valores expressam a média  $\pm$  S.E.M. de 4 animais por grupo.

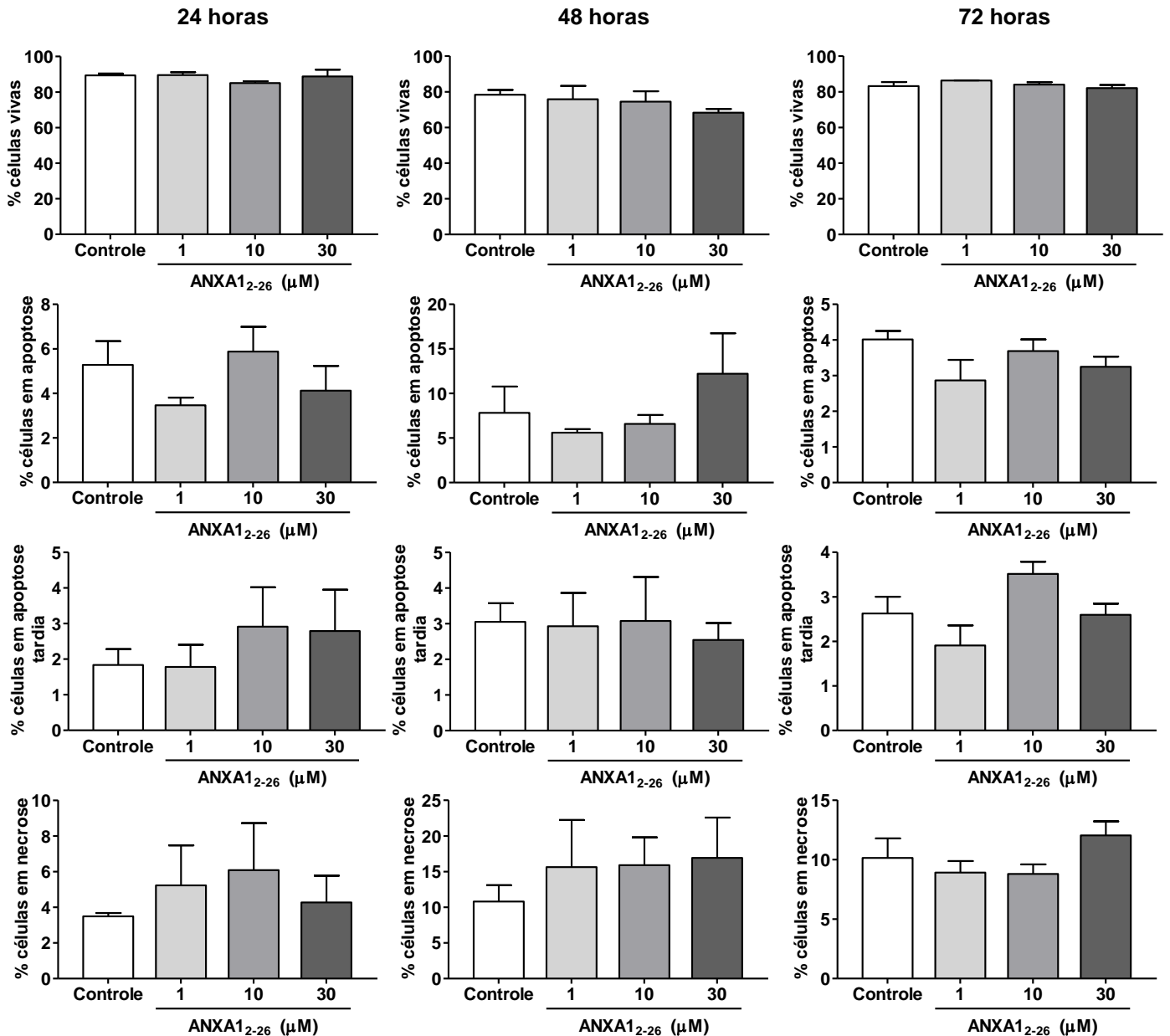
## 4.2. Experimentos *in vitro*

### 4.2.1. Efeito da proteína ANXA1 sobre a viabilidade das células endoteliais

A viabilidade das células endoteliais, analisada nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 e 30  $\mu$ M), mostra que o peptídeo não altera a viabilidade celular, resultado semelhante com a solução tampão (controles). Nos mesmos tempos avaliados, os índices de apoptose, apoptose tardia e necrose foram equivalentes nas células incubadas com peptídeo ou tampão (Figura 10).

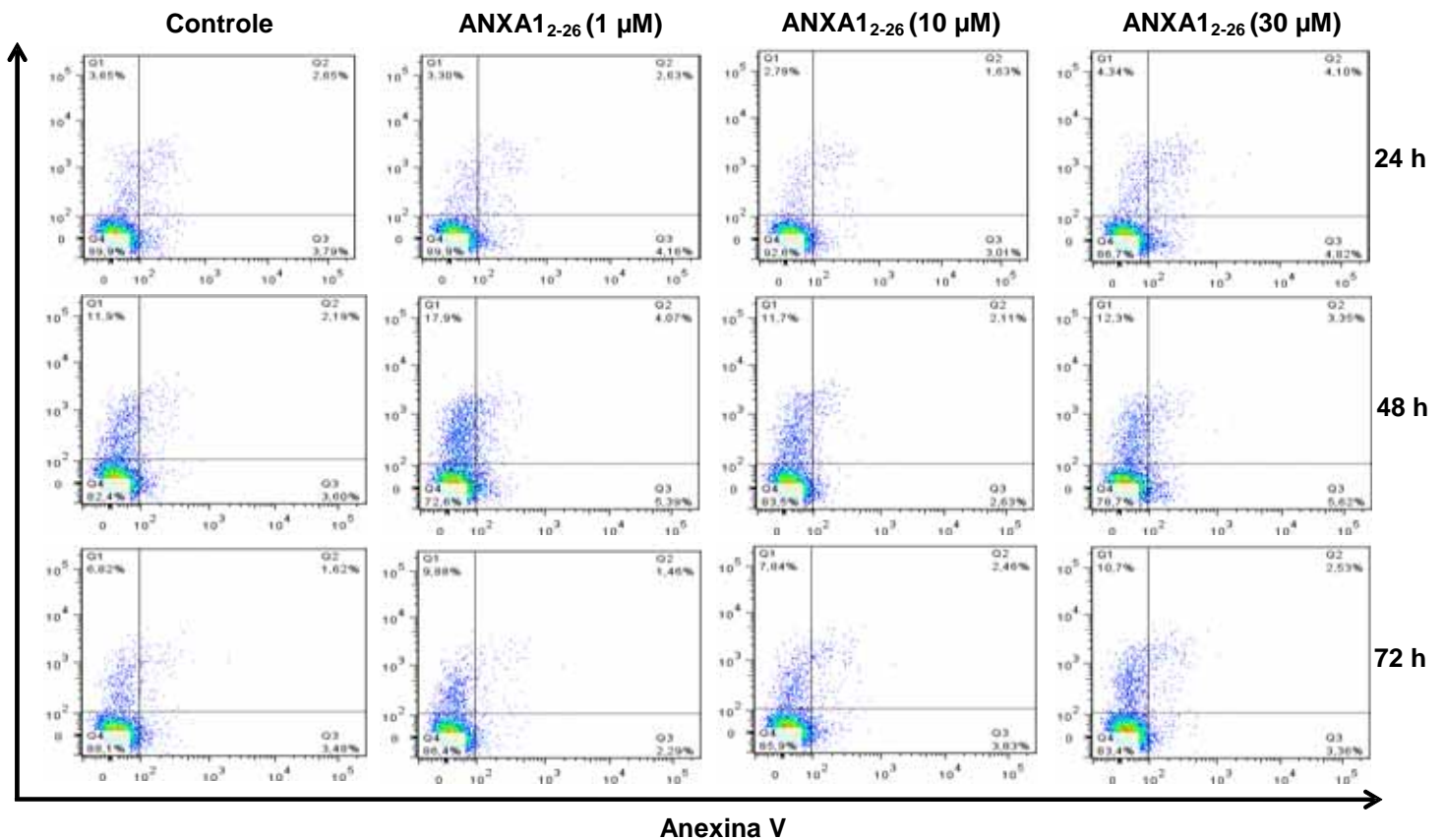
Os histogramas (Figura 11) mostram os resultados obtidos após incubação com anexina V e PI em cada grupo de células. A porção do Q4 representa a porcentagem das células viáveis, ou seja, não apresentam nenhuma marcação, enquanto a porção Q3 mostra a porcentagem de células em apoptose. Quando as células endoteliais são incubadas com os indutores de apoptose, externalizam a proteína fosfatidilserina na membrana celular, marcada pela anexina V.

A anexina V é uma proteína que tem alta afinidade com a fosfatidilserina e, pela conjugação dessa com um fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), é possível quantificar o índice de apoptose por citometria de fluxo. A porção Q1 dos histogramas representa a porcentagem de células em necrose. Nesse caso, os indutores de necrose causam o rompimento na membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Assim, a incubação das células com PI, corante que possui alta afinidade para estruturas intracelulares, como o DNA, a marcação pode ser detectada pelo citômetro de fluxo. Como o PI apresenta fluorescência, conseguimos quantificar a concentração de PI existente no meio intracelular e, conseqüentemente, verificar a porcentagem de células em necrose. A porção Q2 dos histogramas representa a porcentagem de células em apoptose tardia, demonstrando a expressão de fosfatidilserina na sua superfície, quando ocorre ruptura da membrana. Assim, ocorre marcação pela anexina V e coloração com o PI, ou seja, dupla marcação.



**Figura 10. Efeitos do tratamento com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose das células endoteliais.** Células HUVEC foram incubadas com PBS (controle) ou tratadas com ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 μM) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com Anexina-V e/ou PI e, a intensidade de fluorescência, por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± S.E.M. de células de dois ensaios independentes em triplicata.

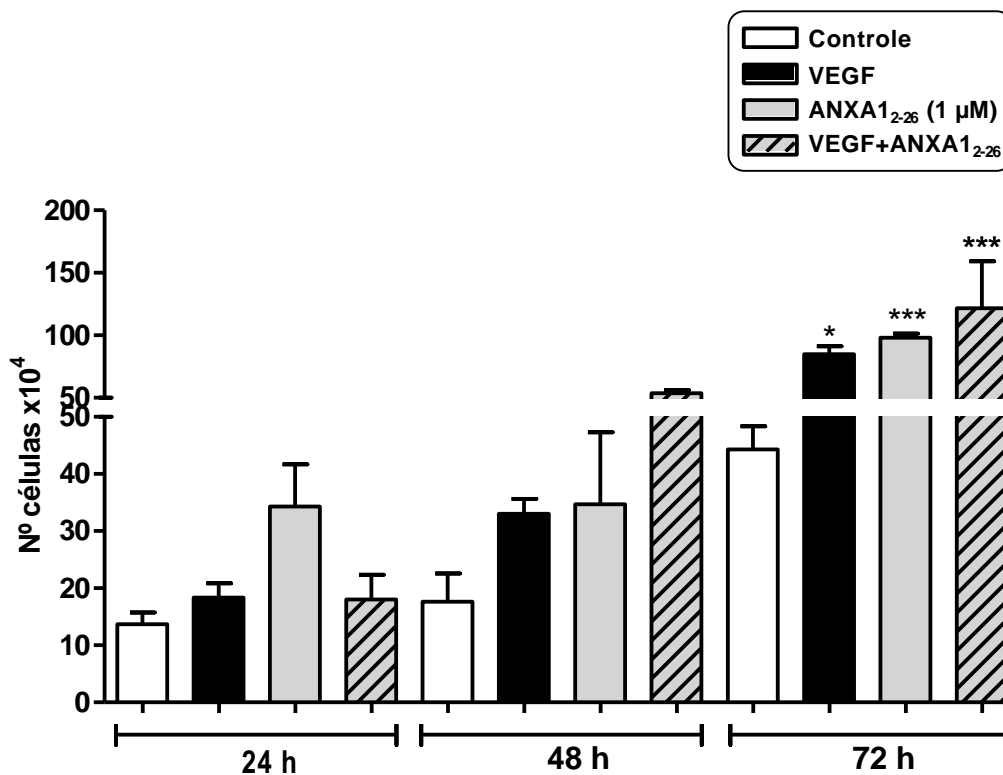




**Figura 11.** Histogramas obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais. Células HUVEC foram incubadas com PBS (controle) ou tratadas com as diferentes concentrações do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 μM), por 24, 48 ou 72 horas. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com Anexina-V e/ou PI e, a intensidade de fluorescência avaliada por citometria de fluxo.

#### 4.2.2 Efeito da ANXA1 sobre a proliferação de células endoteliais

Para análise quantitativa da proliferação celular, as células HUVEC foram incubadas com PBS, VEGF e/ou ANXA1<sub>2-26</sub>. Os resultados obtidos mostram que o peptídeo foi capaz de aumentar a proliferação celular juntamente com a indução pelo VEGF e, somente com ANXA1<sub>2-26</sub>, induz a proliferação celular após 72 horas (Figura 12).

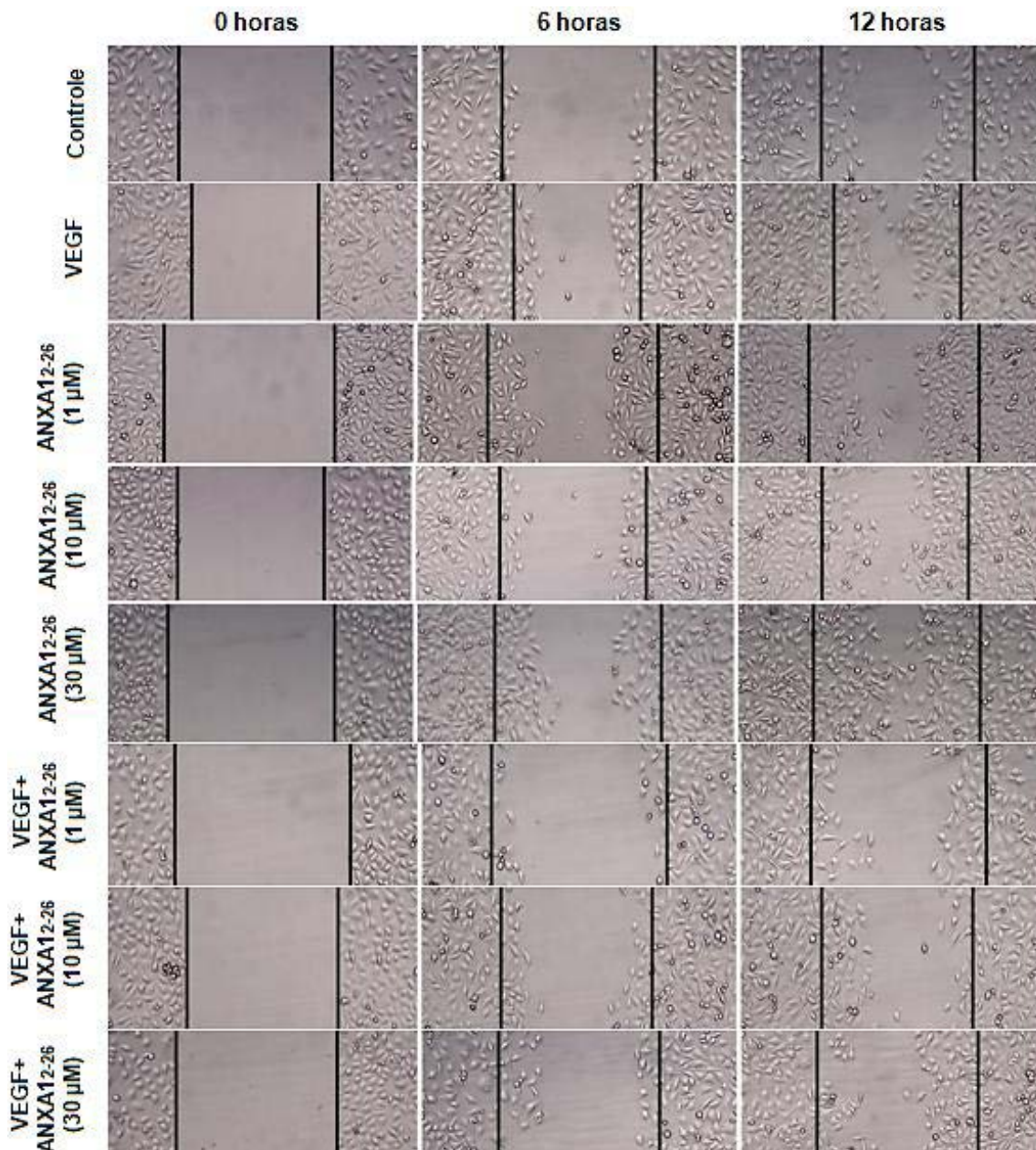


**Figura 12. Análises quantitativas da proliferação celular de células endoteliais.** Células HUVEC foram incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (10 ng/mL) e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1 µM) e, a avaliação da proliferação celular, realizada em 24, 48 e 72 horas por *Countess® Automated Cell Counter* (Invitrogen, UK). Os resultados expressam a média ± S.E.M. de células de três ensaios independentes em triplicata. \* p<0,05 e \*\*\* p<0,001 versus controle.

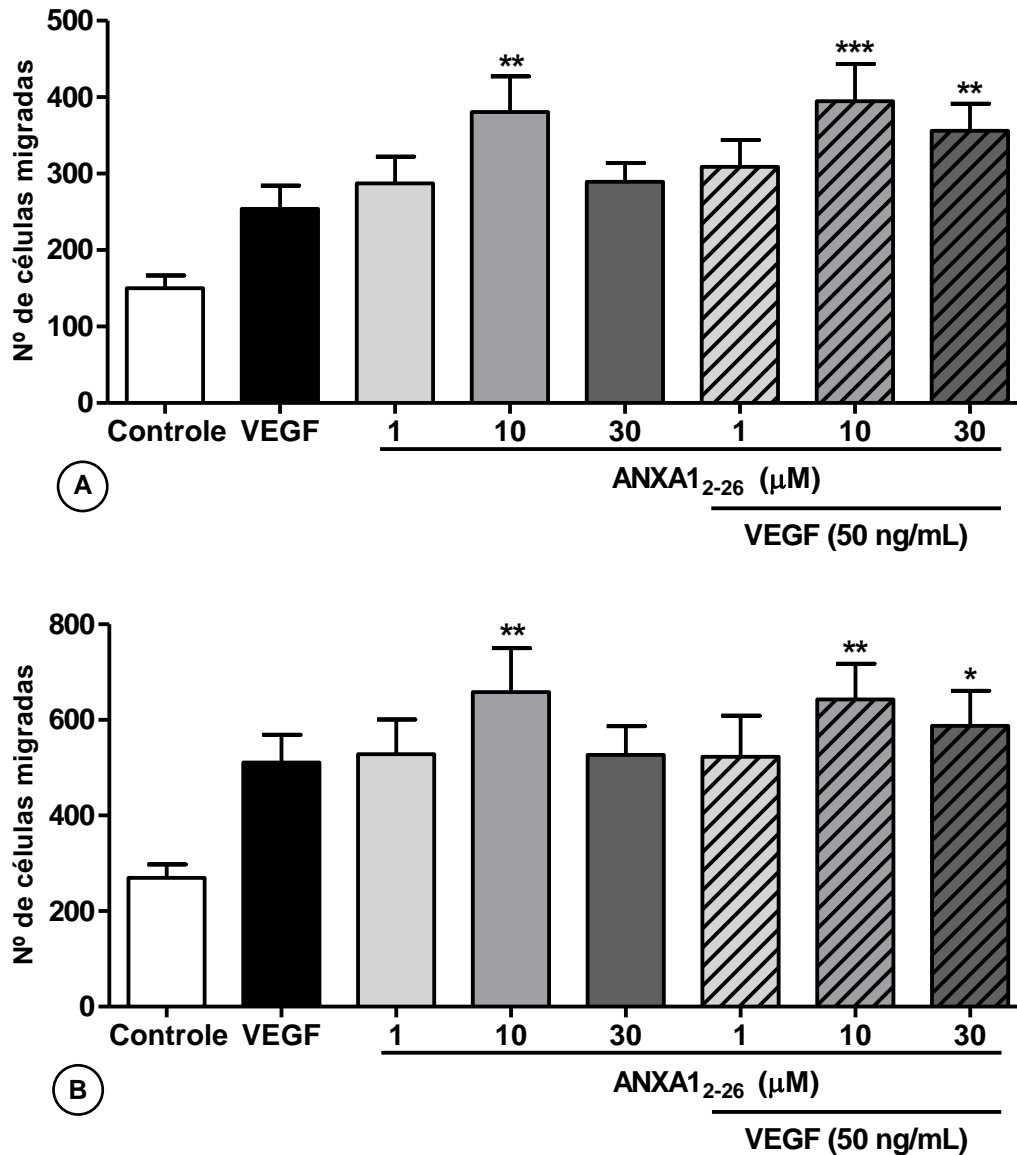


#### 4.2.3. Efeito da ANXA1 sobre a migração de células endoteliais

Os resultados obtidos no ensaio da migração celular, nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 13), mostram aumento significativo da migração das células endoteliais após tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> na concentração de 10  $\mu$ M e, nas concentrações de 10 e 30  $\mu$ M, após estímulo VEGF (Figuras 14 A e B).



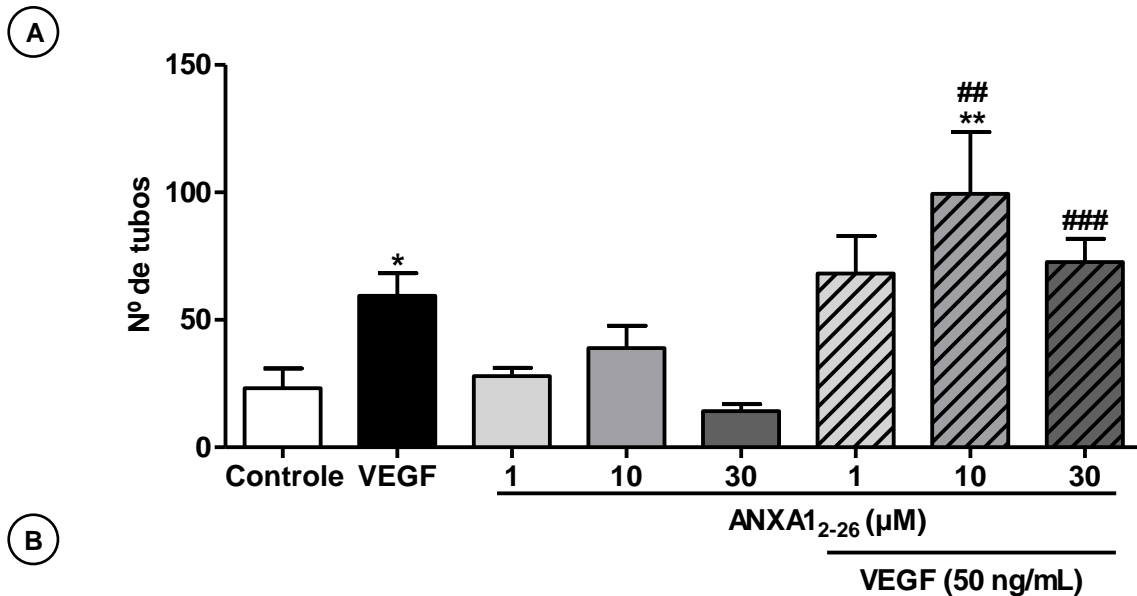
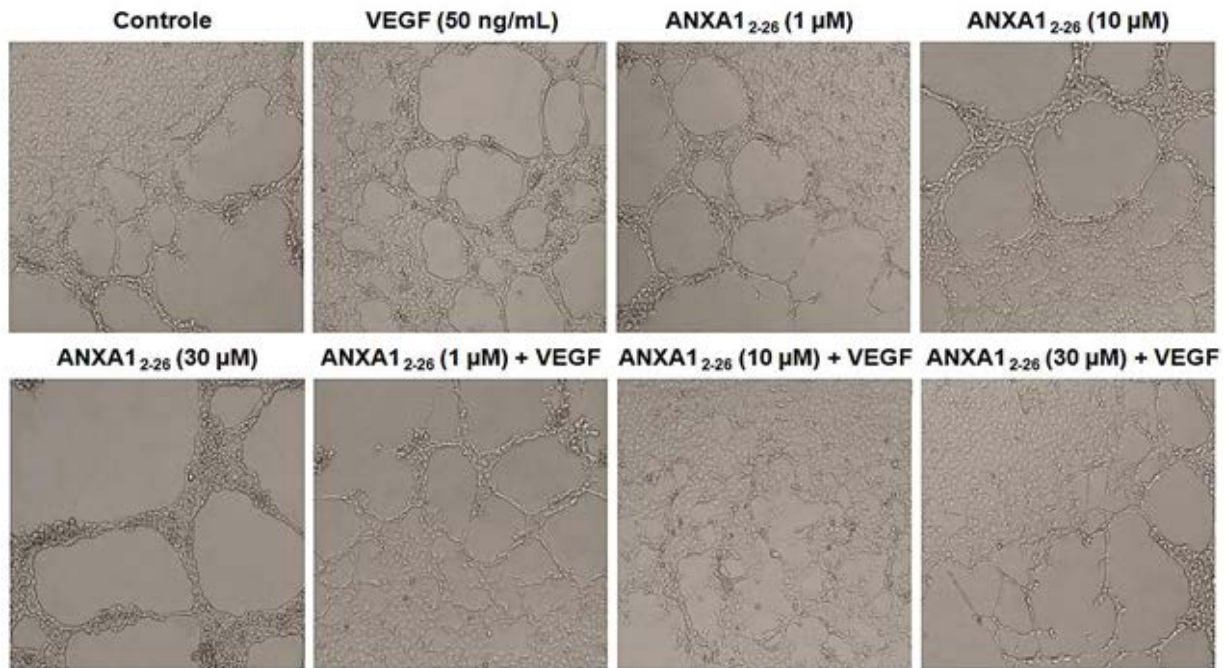
**Figura 13. Fotomicrografias obtidas a partir de microscopia de luz da migração de células endoteliais.** Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (50 ng/mL) e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu$ M), por 0, 6 e 12 horas.



**Figura 14. Efeitos do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a migração celular de células endoteliais.** Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (50 ng/mL) e/ou tratadas com peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 μM). Resultados expressam a média ± S.E.M. de dois ensaios independentes em triplicata. A migração celular foi avaliada em 6 [A] e 12 horas [B], realizando a quantificação das células transmigradas por microscopia de luz. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 versus controle.

#### **4.2.4. Efeito da ANXA1 sobre a formação de tubos pelas células endoteliais**

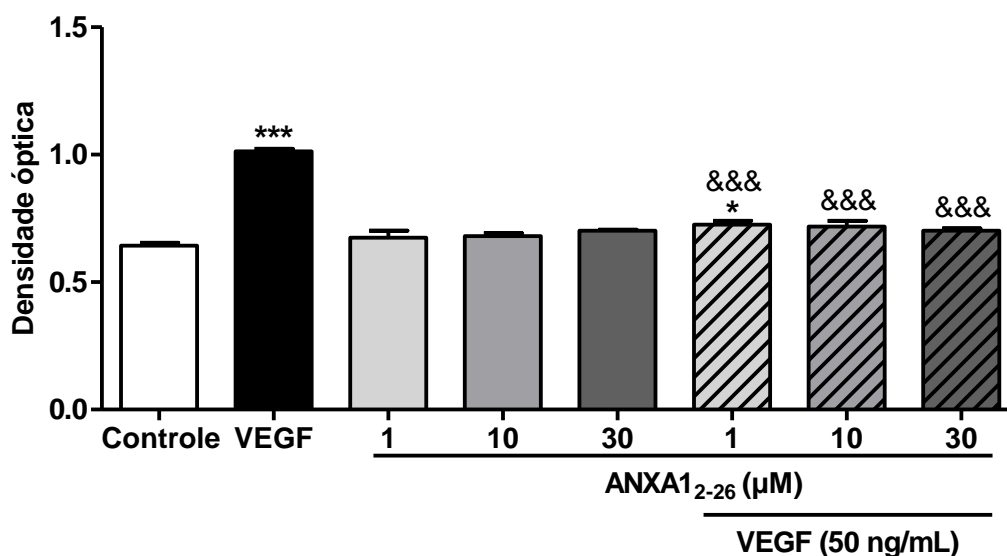
Para as análises quantitativas da formação de tubos, campos diferentes de cada poço foram fotografados na microscopia de luz (Figura 15 A), mostrando aumento significativo da formação dessas estruturas após tratamento com VEGF (Figuras 15 A e B). ANXA1<sub>2-26</sub>, nas concentrações de 1, 10 ou 30  $\mu\text{M}$ , não apresenta efeito sobre o processo de tubulogênese (Figuras 15 A e B). No entanto, após ANXA1<sub>2-26</sub> na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , na presença de VEGF, a formação de estruturas tubulares aumenta significativamente (Figuras 15 A e B). Nossos dados indicam, embora não significativos, que a incubação com ANXA1<sub>2-26</sub> (10  $\mu\text{M}$ ), pode potencializar a ação do VEGF (Figuras 15 A e B).



**Figura 15. Efeitos do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a formação de tubos por células endoteliais.** [A] Fotomicrografias obtidas a partir de microscopia de luz dos tubos formados pelas células HUVEC. [B] Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (50 ng/mL) e/ou tratadas com peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30 μM), por 24 horas. A formação de tubos foi avaliada pela quantificação das estruturas tubulares por microscopia luz. Os resultados expressam a média ± S.E.M. de dois ensaios independentes em triplicata. \*  $p < 0,05$  versus controle e #  $p < 0,05$  versus ANXA1<sub>2-26</sub> (10 e 30 μM respectivamente).

#### 4.2.5. Efeito da ANXA1 sobre a aderência de células endoteliais

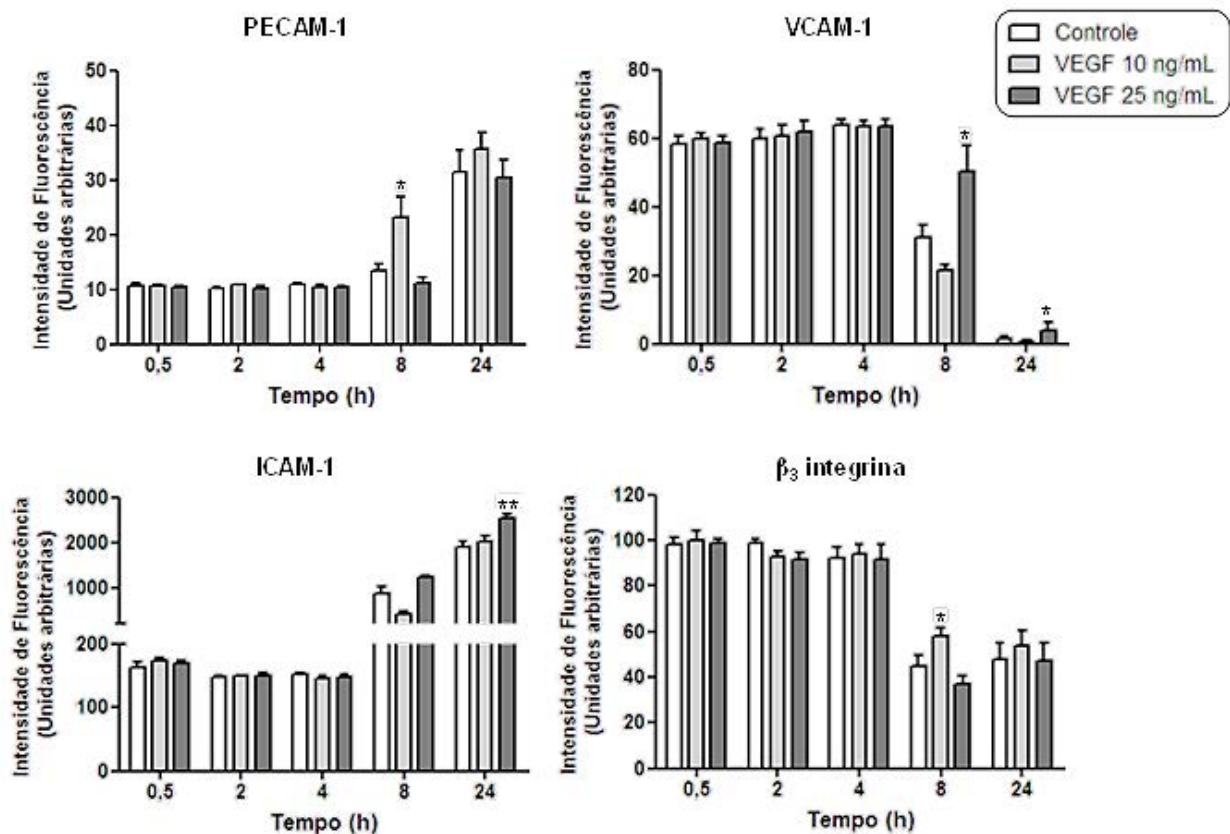
No ensaio das células endoteliais ao Matrigel<sup>®</sup> verificamos aumento significativo da aderência das células após a incubação com o estímulo VEGF. O tratamento somente com ANXA1<sub>2-26</sub>, nas concentrações de 1, 10 ou 30  $\mu\text{M}$ , não altera a aderência das células endoteliais em relação aos controles. Diferentemente, o tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu\text{M}$ ), na presença de VEGF, inibe a aderência celular em relação ao tratamento somente com VEGF (Figura 16).



**Figura 16. Efeitos do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a aderência das células endoteliais ao Matrigel<sup>®</sup>.** Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e, após a aderência celular, incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (50 ng/mL) e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (1, 10 ou 30  $\mu\text{M}$ ) por 2 horas. Após incubação com o corante cristal violeta, a aderência celular foi avaliada por meio do espectrofotômetro. Os resultados expressam a média  $\pm$  S.E.M. de dois ensaios independentes em triplicata. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  versus controle e &&&  $p < 0,001$  versus VEGF.

#### 4.2.6. Padronização do ensaio de avaliação da expressão das moléculas de adesão

Para avaliação da ação da ANXA1 sobre a expressão das moléculas de adesão, envolvidas na angiogênese, foi necessário uma padronização prévia do delineamento experimental para a ação do VEGF sobre a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina. A incubação com VEGF aumenta significativamente na concentração de 10 ng/mL (8 horas), PECAM-1; em 25 ng/mL (8 ou 24 horas), VCAM-1; em 25 ng/mL (24 horas), ICAM-1 e, em 10 ng/mL (8 horas),  $\beta_3$  integrina (Figura 17).



**Figura 17. Efeitos do VEGF sobre a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina em células endoteliais por citometria de fluxo.** Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e, após a aderência celular, incubadas com PBS (controle) ou estimuladas por VEGF (10 ou 25 ng/mL) por diferentes períodos de tempo. Os resultados expressam a média  $\pm$  S.E.M. de dois ensaios independentes em duplicata. \* p < 0,05 e \*\* p < 0,01 *versus* controle.

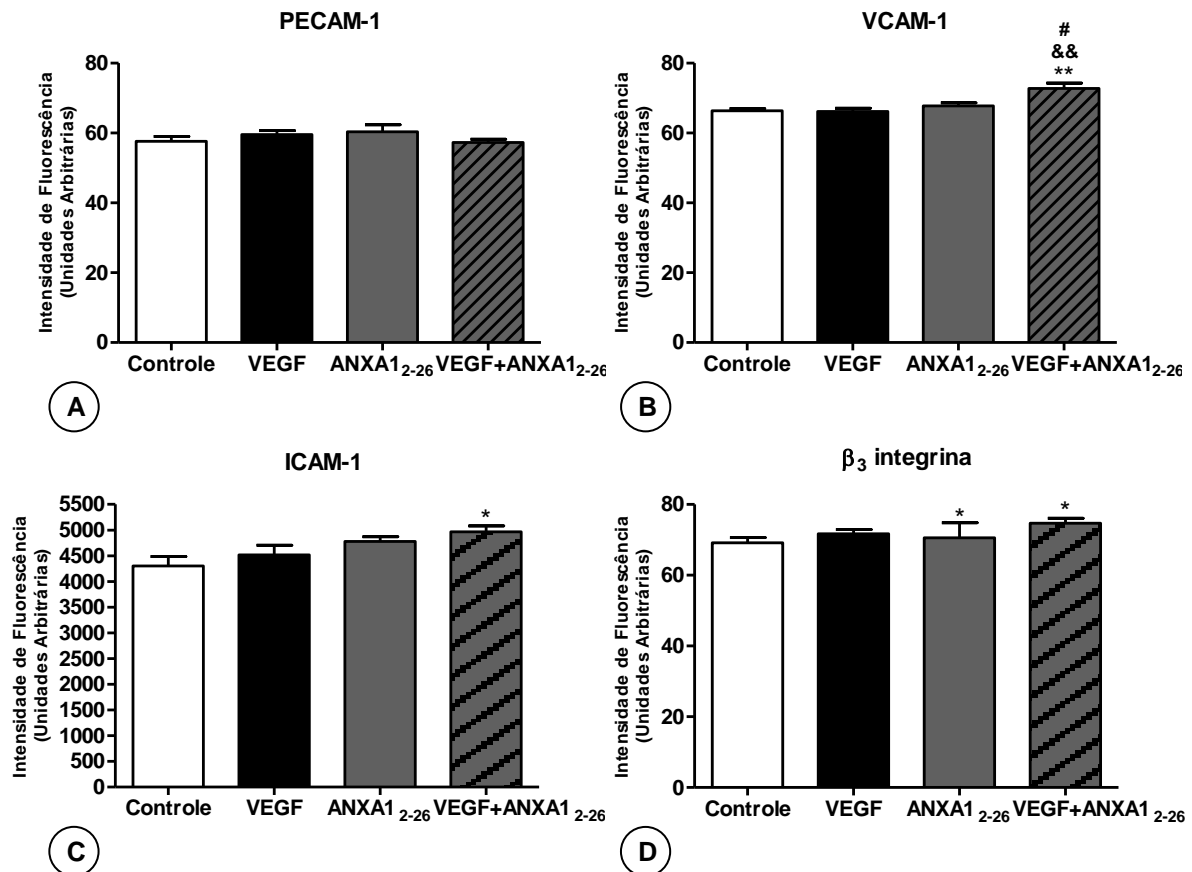


#### **4.2.7. Efeitos da ANXA1 sobre a expressão das moléculas de adesão em células endoteliais**

A partir dos dados obtidos no item 4.2.6., foram iniciados os ensaios para avaliação da ação da ANXA1. Os efeitos do tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub>, sobre a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas (PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1) e da família das integrinas ( $\beta_3$  integrina), estimuladas ou não pelo fator de crescimento VEGF, foram investigados por ensaios de citometria de fluxo em células HUVEC.

O tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub> ou com estímulo VEGF não altera a expressão de PECAM-1 nas células endoteliais (Figura 18 A). Enquanto, a associação do VEGF com ANXA1<sub>2-26</sub> aumenta a expressão de VCAM-1 (Figura 18 B), não altera a expressão basal de ICAM-1, mas aumenta a expressão dessa molécula nas células endoteliais (Figura 18 C).

Na expressão basal de  $\beta_3$  integrina, os resultados mostram aumento após tratamentos somente com ANXA1<sub>2-26</sub> e na associação ANXA1<sub>2-26</sub> e VEGF. Ausência de alteração na expressão com VEGF (Figura 18 D).



**Figura 18. Efeitos do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina em células endoteliais por citometria de fluxo.** Células HUVEC foram mantidas em cultura, plaqueadas e após a aderência celular, incubadas com PBS (controle), estimuladas por VEGF (10 ng/mL) [A], (25 ng/mL) [B, C e D], e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> (30  $\mu$ M) por 8 [A, B e D] e 24 horas [C]. Os resultados expressam a média  $\pm$  S.E.M. de dois ensaios independentes em triplicata. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  versus controle, &&  $p < 0,01$  versus VEGF e #  $p < 0,05$  versus ANXA1<sub>2-26</sub>.



## 5. DISCUSSÃO

---

---

A angiogênese é um processo altamente dinâmico e complexo, sendo fundamental para a embriogênese, sucesso de cicatrizações, transplantes, regeneração tecidual, recuperação pós-isquemia, formação de massas tumorais e metástases de células neoplásicas, entre outros (BERGERS; BENJAMIN, 2003; KARAMYSHEVA, 2008). Tendo em vista a importância desse processo, a descoberta de tratamentos pró-angiogênicos conduz ao estudo de novas possibilidades terapêuticas.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os possíveis efeitos e o mecanismo de ação do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub>, da proteína ANXA1, sobre a formação de novos vasos sanguíneos. Os dados obtidos indicam que o peptídeo induz a formação de novos vasos *in vivo*, e que esse efeito pode ser dependente da ação da ANXA1 sobre os processos *in vitro* de proliferação, migração, aderência, tubulogênese e expressão de moléculas de adesão das células endoteliais.

Com a finalidade de avaliar o efeito do ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a cinética da formação de novos vasos sanguíneos, utilizamos o modelo experimental da câmara dorsal cutânea em animais BALB/c selvagens (WT) e destituídos do gene para anexina A1 (AnxA1<sup>-/-</sup>). Essa metodologia, associada à microscopia, intravital tem sido utilizada no estudo da angiogênese, fornecendo a cinética do processo *in vivo* em diferentes condições (DEBERGH et al., 2010; DOYLE et al., 2012; KNAPIK et al., 2012; GU et al., 2013). Embora alguns trabalhos relacionem a ANXA1 com a regulação da angiogênese, seu papel exato nesse complexo processo ainda não está esclarecido. Nossos dados indicam que a aplicação tópica do peptídeo ou VEGF, sobre a rede microcirculatória da pele dos camundongos, induz a formação de novos vasos sanguíneos em animais WT, o que mostra uma ação pró-angiogênica da proteína ANXA1 em processo não-tumorigênico.

O papel pró-angiogênico da proteína ANXA1 também foi demonstrado em células da linhagem HUVEC co-cultivadas com células de câncer de mama humano (ANBALAGAN et al., 2012) e em modelo de glioma *in vivo* e *in vitro* (CHENG et al., 2013). Nestas condições, a angiogênese também é dependente das ações da ANXA1 sobre as células do estroma do microambiente tumoral. Assim, demonstramos no presente trabalho, pela primeira vez na literatura, o papel do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> como um indutor da angiogênese fisiológica pela

primeira vez na literatura. Pin e colaboradores (2012) mostraram que a ANXA1 é necessária para a migração de células endoteliais induzida por VEGF e, conseqüentemente, um mediador da angiogênese *in vitro* induzida por VEGF. Diferentemente, os nossos dados *in vivo* não suportam esta evidência, visto que a angiogênese induzida por VEGF em camundongos *AnxA1<sup>-/-</sup>* foi semelhante ao observado em camundongos WT. Além disso, o tratamento com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> causou maior aumento na angiogênese quando comparado ao tratamento com VEGF. É importante mencionar que esse modelo experimental mimetiza um processo fisiológico e, portanto, outras células do microambiente fazem parte do sistema biológico.

O modelo experimental da câmara dorsal, utilizado em nossos experimentos *in vivo*, tem sido amplamente empregado para o estudo de novas moléculas com papel na angiogênese, pois pode ser realizado em mamíferos. As imagens da microcirculação são obtidas e comparadas quantitativamente, antes e pós-tratamentos. Essas características conferem vantagens sobre as demais metodologias *in vivo* utilizadas para avaliar a angiogênese (HARDER et al., 2004; STATON; REED; BROWN, 2009). No entanto, é importante salientar que a manipulação cirúrgica para a implantação da câmara dorsal pode causar inflamação de pequena intensidade, visualizada por pontos de edema e hemorragia, diminuindo o processo após o terceiro dia de implantação. Por essa razão, os tratamentos tópicos com PBS, VEGF e/ou peptídeo foram iniciados após esse período.

Além de investigar o efeito do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a rede microcirculatória dos camundongos, avaliamos sua ação sobre a permeabilidade vascular. Este evento fisiológico regula o intercâmbio celular e humoral entre os capilares e tecidos, sendo imprescindível para um funcionamento harmonioso do organismo. Porém, quando atenuado, leva a alterações na angiogênese, inflamação, câncer e formação de metástases, processos caracterizados pelo aumento da permeabilidade vascular (WANG; DUDEK, 2009). Nossos resultados mostram que o tratamento subcutâneo com ANXA1<sub>2-26</sub>, em animais WT ou *AnxA1<sup>-/-</sup>*, não altera a permeabilidade vascular nas condições basais ou vigência do estímulo VEGF. Outro modelo experimental de inflamação pulmonar, induzido por lipopolissacarídeo, mostrou que o tratamento prévio com ANXA1<sub>2-26</sub> inibe a permeabilidade vascular e

migração de leucócitos dos vasos para o tecido, eliminando o processo inflamatório (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012). Como o início da angiogênese é marcado pelo aumento da permeabilidade vascular e o ANXA1<sub>2-26</sub> induz a formação de novos vasos, sugerimos que nesse modelo experimental o aumento da permeabilidade seja causado por outros fatores envolvidos no processo pró-angiogênico e que deverão ser investigados.

Pela relevância das características fenotípicas e funcionais das células humanas HUVEC na angiogênese e para confirmar os dados obtidos *in vivo*, subsequentemente avaliamos a proteína ANXA1 nesse tipo celular. As células HUVEC estimuladas por VEGF e/ou tratadas com o peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> foram avaliadas nos seguintes aspectos: viabilidade, proliferação, migração, formação de tubos, aderência e expressão de moléculas de adesão. Os resultados obtidos indicam que a ANXA1 está envolvida nos mecanismos do processo de angiogênese, pois o tratamento aumenta a proliferação, migração e expressão da molécula de adesão  $\beta_3$  integrina nas células endoteliais. Após estímulo com o VEGF, associado com ANXA1<sub>2-26</sub>, também foi observado aumento no processo de tubulogênese. Além disso, essa proteína pode influenciar, modulando negativamente, a resposta do VEGF na aderência celular.

Inicialmente, a ação tóxica do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre as células endoteliais foi excluída pela observação da manutenção da viabilidade celular em ensaios que mensuraram a morte celular por apoptose e necrose. Nessas investigações, a viabilidade das células endoteliais após tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub>, nas concentrações de 1, 10 e 30  $\mu\text{M}$  e nos diferentes períodos (24, 48 e 72 horas) não mostram diferenças em relação aos controles. Além disso, não ocorreu indução de apoptose, apoptose tardia e necrose em nenhuma das condições experimentais avaliadas. Esses dados asseguram que o tratamento com o peptídeo não possui efeito citotóxico sobre as células HUVEC, podendo ser utilizado nos estudos subsequentes.

Como o início do processo de angiogênese é marcado pela destruição da parede dos vasos sanguíneos pré-existentes, seguido da migração das células endoteliais para o espaço perivascular e, posterior, ativação da proliferação dessas células (KARAMYSHEVA, 2008; BERGERS; BENJAMIN, 2003), avaliamos a proliferação celular da linhagem HUVEC. Nesse contexto, mostramos que o ANXA1<sub>2-26</sub>, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , induz proliferação

celular em HUVEC, tanto nas condições basais, como após estímulo pelo VEGF em 72 horas de incubação. Nossos dados sugerem que a ANXA1 pode controlar o ciclo celular e seu exato papel terá que ser avaliado. Ressaltamos que a ação da ANXA1 na proliferação celular tem sido evidenciada em modelos de inflamação e tumor (JIA et al., 2013; BIZZARRO et al., 2012; YANG et al., 2011). No entanto, não há dados na literatura para o estudo da proteína ANXA1 nas células endoteliais HUVEC.

O efeito do peptídeo sobre a migração das células endoteliais foi avaliado, visto que esse evento apresenta um papel crucial para a formação de novos vasos. Nesse processo observamos que o tratamento, após 6 e 12 horas somente com ANXA1<sub>2-26</sub>, intensifica a migração na concentração de 10  $\mu$ M e, juntamente com o estímulo VEGF nas concentrações de 10 e 30  $\mu$ M. Anteriormente, Williams e colaboradores (2010) mostraram que a ANXA1 pode apresentar ação pró-inflamatória na migração transendotelial dos neutrófilos. Pin e colaboradores (2012), utilizando células HUVEC, mostraram que a ANXA1 é um importante regulador da migração celular e do processo de angiogênese mediadas pelo VEGF, sugerindo também uma ação pró-angiogênica para essa proteína. A ANXA1 medeia a formação da projeção do citoesqueleto de actina (lamelipódios) na superfície da célula endotelial onde ocorre a interação com VEGF (PIN et al., 2012). Outro estudo mostra que a ANXA1 é expressa em células endoteliais da região de brotamento da aorta de animais WT (YI; SCHNITZER, 2009) e, aortas de ratos KO apresentam brotamento celular prejudicado, processo que foi revertido por expressão adenoviral de ANXA1 (YI; SCHNITZER, 2009).

A fim de complementar os resultados obtidos da ação do peptídeo nas propriedades migratórias das células endoteliais, o passo subsequente foi avaliar sua ação no processo de tubulogênese. O ensaio de formação de tubos avalia a capacidade das células endoteliais em degradar a matriz extracelular, migrar nessa matriz, se organizar e unir, formando estruturas tubulares. Esse último processo está estritamente relacionado à expressão de moléculas de adesão expressas nas junções interendoteliais que apresentam papel na adesão heterotípica e homotípica (TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012). Nossos dados mostram que os tratamentos com o peptídeo, nas concentrações de 1, 10 e 30  $\mu$ M, não apresentam efeitos sobre o processo de

tubulogênese. No entanto, após estímulo com VEGF e tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub>, na concentração de 10 µM, ocorre aumento significativo na formação de estruturas tubulares. O peptídeo intensifica a ação do fator de crescimento VEGF promovendo a formação de tubos, sugerindo sua participação nos mecanismos intracelulares da tubulogênese.

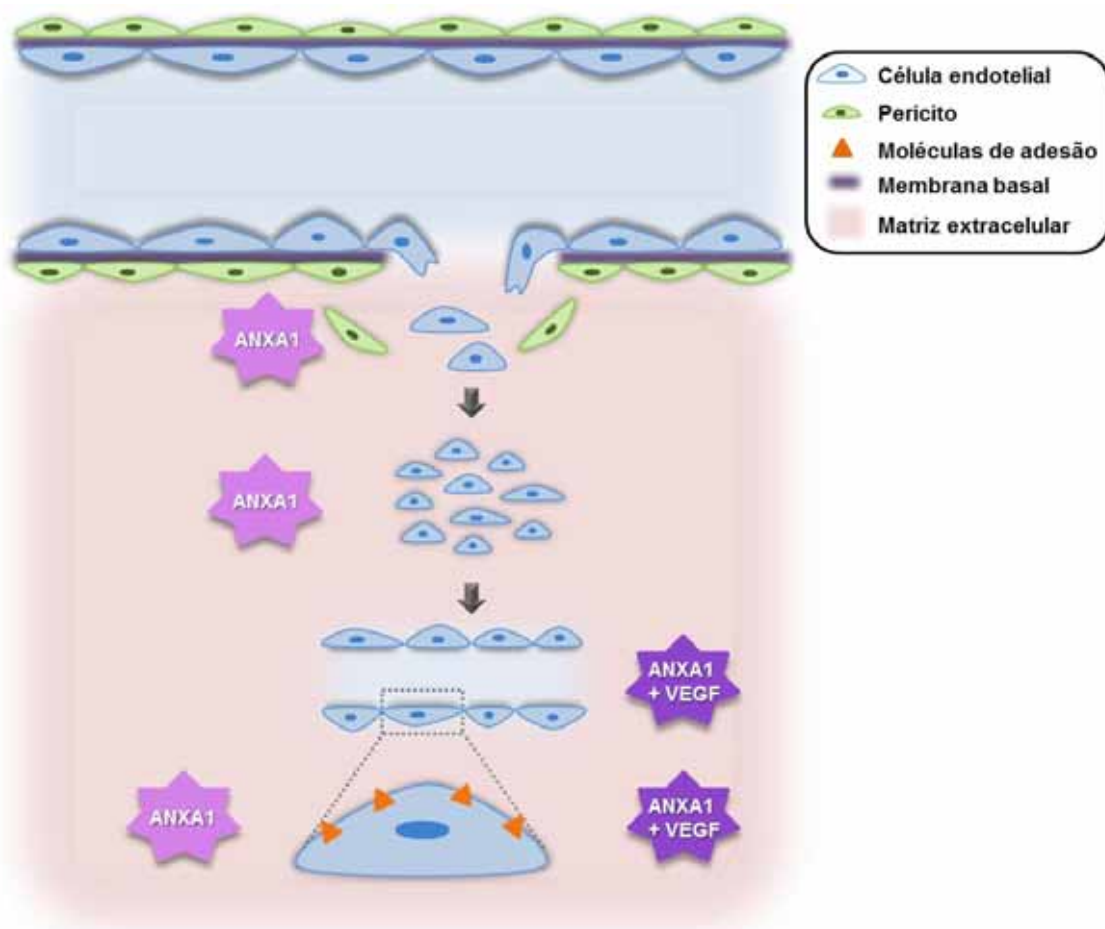
Os dados acima motivaram o estudo do efeito do peptídeo ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a aderência das células endoteliais ao Matrigel<sup>®</sup>, que mimetiza a composição da matriz extracelular. O tratamento com ANXA1<sub>2-26</sub>, nas concentrações de 1, 10 e 30 µM, não altera a adesão das células endoteliais ao gel tridimensional, enquanto o VEGF aumenta essa adesão celular. Diferentemente, o tratamento com peptídeo e estímulo VEGF inibe a adesão celular. Esses resultados sugerem que a ANXA1 pode bloquear a ação do VEGF por mecanismos ainda desconhecidos, modulando de alguma forma sua função. No entanto, estudo mostrou que a proteína ANXA1 pode destacar os neutrófilos das células endoteliais vasculares, em modelos *in vivo* e *in vitro*, por clivagem da selectina CD62L em neutrófilos em processo de rolamento (D'ACQUISTO; PERRETTI, 2009). Esta ação inibitória sobre a adesão neutrófilos a células endoteliais tem sido proposta como um mecanismo de ação anti-inflamatória da ANXA1 (D'ACQUISTO; PERRETTI, 2009). No entanto, não há evidências descritas sobre a ANXA1 nas propriedades de adesão das células endoteliais, mas os dados aqui obtidos mostram claramente que o peptídeo inibe a aderência induzida pelo VEGF. O VEGF interage com seu receptor nas células endoteliais e induz adesão aos componentes da matriz extravascular por ativação da família das integrinas (PERROT-APPLANAT; DI BENEDETTO, 2012). Dentre as diferentes integrinas expressas pelas células endoteliais destacamos os receptores de colágeno ( $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ ), laminina ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  e  $\alpha_6\beta_4$ ), vibronectina ( $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ ), fibronectina ( $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ ) e osteopontina ( $\alpha_9\beta_1$ ) (FRIEDLANDER et al., 1995; GONG; CHATTERJEE, 2003; RAMJAUM; HODIVALA-DILKE, 2009).

Com base nessas considerações, e pelo fato que não há dados na literatura da proteína ANXA1 na expressão de moléculas de adesão endoteliais, o nosso objetivo subsequente foi investigar a ação do ANXA1<sub>2-26</sub> sobre a expressão dessas moléculas. Estatisticamente, nossos resultados mostram, que o peptídeo e/ou estímulo por VEGF aumentam a expressão

basal das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina. Essas moléculas atuam em fases diferentes do processo de angiogênese, sendo essenciais na formação de novos vasos (BANKS et al., 1993; GHO; KLEINMAN; SOSNE, 1999; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Concluindo, nossos resultados indicam que a ANXA1 apresenta ação pró-angiogênica, controlando os processos de proliferação e migração celular. Essa proteína tem sido descrita como anti-inflamatória (PERRETTI, 1998; GAVINS et al., 2003) desde sua descoberta por Flower e Blackwell (1979). Porém, estudos recentes têm indicado a ANXA1 como tendo ações pró-inflamatória e pró-angiogênica, favorecendo a migração transendotelial de neutrófilos e o crescimento tumoral (YI; SCHNITZER, 2009; WILLIAMS et al., 2010).

Em resumo (Figura 19), nossos dados indicam que a ANXA1, na angiogênese, participa das seguintes etapas: induz a formação de novos vasos, a proliferação, a migração celular, a expressão da molécula de adesão  $\beta_3$  integrina e, na presença do VEGF, acentua o processo de tubulogênese e diminui a aderência nas células endoteliais.



**Figura 19. Modelo que resume o mecanismo de ação da proteína ANXA1 nas células endoteliais durante o processo de angiogênese.** ANXA1 aumenta migração, proliferação e expressão de  $\beta_3$  integrina das células endoteliais, enquanto ANXA1 + VEGF aumenta tubulogênese e expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina nessas células, eventos cruciais na formação de novos vasos.

A compreensão sobre o crescimento dos vasos sanguíneos e o progresso no entendimento das bases moleculares da angiogênese (EBOS; KERBEL, 2011; GARDLIK; CELEC; BERNADIC, 2011) são desafios para se alcançar o sucesso de transplantes, reparo e regeneração tecidual, cicatrização de feridas e recuperação pós-isquemia. Assim, nossos dados revelam ações pró-angiogênicas da proteína ANXA1 no processo de angiogênese, o que pode representar um avanço nas investigações terapêuticas.



## 6. CONCLUSÕES

---

---

Os resultados obtidos, com os camundongos BALB/c selvagens (WT), os destituídos do gene para ANXA1 (AnxA1<sup>-/-</sup>) e as células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC), permitem concluir que o tratamento com a proteína anexina A1 (ANXA1):

1. Aumenta a formação de novos vasos sanguíneos na microcirculação dorsal dos animais WT, enquanto o VEGF aumenta nos animais WT e AnxA1<sup>-/-</sup>.
2. Não altera a permeabilidade vascular dos vasos nas condições basais ou associada ao estímulo VEGF.
3. Não apresenta efeito citotóxico sobre as células endoteliais, mantendo a viabilidade celular, não induzindo a apoptose, apoptose tardia e necrose.
4. Aumenta a proliferação celular na presença ou ausência do VEGF.
5. Aumenta a migração celular na presença ou ausência do VEGF.
6. Não apresenta efeito sobre a tubulogênese, porém na associação como VEGF aumenta esse processo e intensifica a ação desse fator de crescimento.
7. Não altera a aderência das células endoteliais ao Matrigel, porém, na presença do VEGF inibe a aderência celular promovida por esse fator de crescimento.
8. Aumenta a expressão da molécula  $\beta_3$  integrina nas células endoteliais, não altera PECAM-1 e, junto ao estímulo VEGF, aumenta VCAM-1, ICAM-1 e  $\beta_3$  integrina.

Assim, nossos dados revelam que a proteína ANXA1 apresenta um papel pró-angiogênico em algumas circunstâncias, o que pode representar um avanço nas investigações terapêuticas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

ALLCOCK, G.H.; ALLEGRA, M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 123, n. 1, p. 62-7, 2001.

ARAUJO, L.P.; TRUZZI, R.P.; MENDES, G.E.; LUZ, M.A.; BURDMANN, E.A.; OLIANI, S.M. Annexin A1 protein attenuates cyclosporine-induced renal hemodynamics changes and macrophage infiltration in rats. **Inflammation Research**, v. 61, n. 3, p. 189-96, 2012.

ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPE, M.L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p. 226-35, 2010.

ANBALAGAN, D.; YAP, G.; YUAN, Y.; PANDEY, V.K.; LAU, W.H.; ARORA, S.; BIST, P.; WONG, J.S.; SETHI, G.; NISSOM, P.M.; LOBIE, P.E.; LIM, L.H. Annexin-A1 Regulates MicroRNA-26b\* and MicroRNA-562 to Directly Target NF- $\kappa$ B and Angiogenesis in Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-20, 2014.

BANKS, R.E.; GEARING, A.J.H.; HEMINGWAY, I.K.; NORFOLK, D.R.; PERREN, T.J.; SELBY, P.J. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 1, p. 122-4, 1993.

BERGERS, B.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-10, 2003.

BIZZARRO, V.; FONTANELLA, B.; FRANCESHELLI, S.; PIROZZI, M.; CHRISTIAN, H.; PARENTE, L.; PETRELLA, A. Role of annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 757-65, 2010.

BROOKS, P.C.; CLARK, R.A.; CHERESH, D.A. Requirement of vascular integrin  $\alpha$  v  $\beta$  3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 5158, p. 569-71, 1994.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature**, v. 6, n. 4, p. 389-95, 2000.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-57, 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature**, v. 9, n. 6, p. 653-60, 2003.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.

CHENG, L.; HUANG, Z.; ZHOU, W.; WU, Q.; DONNOLA, S.; LIU, J.K.; FANG, X.; SLOAN, A.E.; MAO, Y.; LATHIA, J.D.; MIN, W.; MCLENDON, R.E.; RICH, J.N.; BAO, S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. **Cell**, v. 1, n. 153, p. 139-52, 2013.

CIRINO, G.; FLOWER, R.J. Human recombinant lipocortin 1 inhibits prostacyclin production by human umbilical artery in vitro. **Prostaglandins**, v. 34, n. 1, p. 59-62, 1987.

COLE, C.L.; JAYSON, G.C. Oligosaccharides as anti-angiogenic agents. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 3, p. 351-62, 2008.

CONWAY, M.E.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 3, p. 507-21, 2001.

CÔTÉ, M.C.; LAVOIE, J.R.; HOULE, F.; POIRIER, A.; ROUSSEAU, S.; HUOT, J. Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8013-21, 2010.

CRAFTS, T.D.; JENSEN, A.R.; BLOCHER-SMITH, E.C.; MARKEL, T.A. Vascular endothelial growth factor: Therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 385-93, 2015.

D'ACQUISTO, F.; PIRAS, G.; RATTAZZI, L. Pro-inflammatory and pathogenic properties of annexin-A1: the whole is greater than the sum of its parts. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1213-8, 2013.

D'ACQUISTO, F.; MERGHANI, A.; LECONA, E.; ROSIGNOLI, G.; RAZA, K.; BUCKLEY, C.D.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095-102, 2007.

D'ACQUISTO, F.; PASCHALIDIS, N.; RAZA, K.; BUCKLEY, C.D.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4+ T cells. **Rheumatology**, v. 47, n. 5, p. 636-9, 2008.

DA CUNHA, E.E.; OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 303-11, 2012.

D'ACUNTO, C.W.; GBELCOVA, H.; FESTA, M.; RUMML, T. The complex understanding of annexin A1 phosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 1, p. 173-8, 2014.

DATTA, A.; BRYANT, D.M.; MOSTOV, K.E. Molecular regulation of lumen morphogenesis. **Current Biology**, v. 21, n. 3, p. 126-36, 2011.

DAVIS, G.E. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 182, n. 3, p. 1025-31, 1992.

DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. **Nature**, v. 5, n. 4, p. 261-70, 2004.

DELLIAN, M.; WITWER, B.P.; SALEHI, H.A.; YUAN, F., JAIN, R.K. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice. **The American Journal Pathology**, v. 149, n. 1, p. 59-71, 1996.

DELISSER, H.M.; CHRISTFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R.M.; BURDICK, M.D.; ROBINSON, C.S.; WEXLER, R.S.; KERR, J.S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J.R.; MADRI, J.A.; ALBELDA, S.M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 151, n. 3, p. 671-77, 1997.

DEBERGH, I.; VAN DAMME, N.; PATTYN, P.; PEETERS, M.; CELEN, W.P. The low-molecular-weight heparin, nadroparin, inhibits tumour angiogenesis in a rodent dorsal skinfold chamber model. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 5, p. 837-43, 2010.

DESDROSELLIER, J.S.; CHERESH, D. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

DEVEZA, L.; CHOI, J.; YANG, F. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. **Theranostics**, v. 2, n. 8, p. 801-14, 2012.

DORMOND, O.; LEJEUNE, F.J.; RUEGG, C. Modulation of cdk2, cyclin D1, p16INK4a, 21WAF and p27Kip1 expression in endothelial cells by TNF/IFN gamma. **Anticancer Research**, v. 22, n. 6, p. 3159-63, 2002.

DOYLE, M.E.; PERLEY, J.P.; SKALAK, T.C. Bone marrow-derived progenitor cells augment venous remodeling in a mouse dorsal skinfold chamber model. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32815, 2012.

DREWES, C.C. **Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a angiogênese in vivo induzida pelo VEGF**. 2011. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DREWES, C.C.; DIAS, R.Y.S.; HEBEDA, C.B.; SIMONS, S.M.; BARRETO, S.A.; FERREIRA JUNIOR, J.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FARSKY, S.H.P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 333-40, 2012.

EBOS, J.M.L.; KERBEL, R.S. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. **Nature**, v. 8, n. 4, p. 210-21, 2011.

EL KEBIR, D.; JÓZSEF, L.; FILEP, J.G. Opposing regulation of neutrophil apoptosis through the formyl peptide receptor-like 1/lipoxin A4 receptor: implications for resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 3, p. 600-6, 2008.

FAM, N.P.; VERMA, S.; KUTRYK, M.; STEWART, D.J. Clinician guide to angiogenesis. **Circulation**, v. 108, n. 21, p. 2613-18, 2003.

FLOWER, R.J.; BLACKWELL, G.J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, n. 5703, p. 456-9, 1979.

FRANCAVILLA, C.; MADDALUNO, L.; CAVALLARO, U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 5, p. 298-309, 2009.

FRIEDLANDER, M.; BROOKS, P.C.; SHAFFER, R.W.; KINCAID, C.M.; VARNER, J.A.; CHERESH, D.A. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. **Science**, v. 270, n. 5241, p. 1500-2, 1995.

GARDLIK, R.; CELEC, P.; BERNADIC, M. Targeting angiogenesis for cancer (gene) therapy. **Bratislavske lekarske listy**, v. 112, n. 8, p. 428-34, 2011.

GASTARDELO, T.S.; DAMAZO, A.S.; DALLI, J.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 177-83, 2009.

GAVINS, F.N.; YONA, S.; KAMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-7, 2003.

GERHARDT, H.; GOLDING, M.; FRUTTIGER, M.; RUHRBERG, C.; LUNDKVIST, A.; ABRAMSSON, A.; JELTSCH, M.; MITCHELL, C.; ALITALO, K.; SHIMA, D.; BETSHOLTZ, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. **The Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 6, p. 1163-77, 2003.

GERKE, V.; CREUTZ, C.E.; MOSS, S.E. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signaling to membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cellular Biology**, v. 6, n. 6, p. 449-61, 2005.

GHERSI, G. Roles of molecules involved in epithelial/mesenchymal transition during angiogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 13, p. 2335-55, 2008.

GHO, Y.S.; KLEINMAN, H.K.; SOSNE, G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. **Cancer Research**, v. 59, n. 20, p. 5128-32, 1999.

GEUDENS, I.; GERHARDT, H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. **Development**, v. 138, n. 21, p. 4569-83, 2011.

GIL, C.D.; LA, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. The interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous

proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell and Molecular Biology**, v. 4, n. 30, p. 338-44, 2006.

GIROL, A.P.; MIMURA, K.K.; DREWES, C.C.; BOLONHESIS, S.S.; SOLITO, E.; FARSKY, S.H.; GIL, C.D.; OLIANI, S.M. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **The Journal immunology**, v. 190, n. 11, p. 5689-701, 2013.

GONG, N.; CHATTERJEE, S. Platelet endothelial cell adhesion molecule in cell signaling and thrombosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1-2, p. 151-8, 2003.

GOULDING, N.J.; GODOLPHIN, J.L.; SAMPSON, M.B.; MADDISON, P.J.; FLOWER, R.J. Hydrocortisone induces lipocortin 1 production by peripheral blood mononuclear cells in vivo in man. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, n. 2, p. 306-7, 1990.

GOULDING, N.J.; LUYING, P.; GUYRE, P.M. Characteristics of lipocortin 1 binding to the surface of human peripheral blood leucocytes. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, n. 6, p. 1237-8, 1990.

GU, Y.; SCHEUER, C.; FENG, D.; MENGER, M.D.; LASCHKE, M.W. Inhibition of angiogenesis: a novel antitumor mechanism of the herbal compound arctigenin. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 8, p. 781-91, 2013.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenesis switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-64, 1996.

HARDER, Y.; AMON, M.; ERNI, D.; MENGER, D. Evolution of Ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. **Journal of Surgical Research**, v. 121, n. 2, p. 197-205, 2004.

HELLSTROM, M.; PHNG, L.K.; GERHARDT, H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. **Cell Adhesion & Migration**, v. 1, n. 3, p. 133-6, 2007.

HOGAN, B.L.; KOLODZIEJ P.A. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 7, p. 513-23, 2002.

HOEHENWARTER, W.; TANG, Y.; ACKERMANN, R.; PLEISSNER, K.P.; SCHMID, M.; STEIN, R.; ZIMNY-ARNDT, U.; KUMAR, N.M.; JUNGBLUT, P.R. Identification of proteins that modify cataract of mouse eye lens. **Proteomics**, v. 8, n. 23-4, p. 5011-24, 1988.

ILAN, N.; MADRI, J.A. PECAM-1: old friend, new partners. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 515-24, 2003.



JIA, Y.; MORAND, E.F.; SONG, W.; CHENG, Q.; STEWART, A.; YANG, Y.H. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 476-84, 2013.

KAMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 39-47, 2005.

KARAMYSHEVA, A.F. Mechanisms of Angiogenesis. **Biochemistry**, v. 73, n. 7, p. 751-62, 2008.

KESISIS, G.; BROXTERMAN, H.; GIACCONE, G. Angiogenesis inhibitors. drug selectivity and target specificity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 27, p. 795-809, 2007.

KEVIL, C.G.; ORR, A.W.; LANGSTON, W.; MICKETT, K.; MURPHY-ULLRICH, J.; PATEL, R.P.; KUCIK, D.F.; BULLARD, D.C. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 19230-8, 2004.

KIM, I.; MOON, S.O.; KIM, S.H.; KIM, H.J.; KOH, Y.S.; KOH, G.Y. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7614-20, 2001.

KNAPIK, A.; HEGLAND, N.; CALCAGNI, M.; ALTHAUS, M.; VOLLMAR, B.; GIOVANOLI, P.; LINDENBLATT, N. Metalloproteinases facilitate connection of wound bed vessels to pre-existing skin graft vasculature. **Microvascular Research**, v. 84, n. 1, p. 16-23, 2012.

KWEEL, L.; BALDWIN, H.S.; SHEN, H.M.; STEWART, C.L.; BUCK, C.; BUCK, C.A.; LABOWL, M.A. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. **Roche research center**, v. 121, n. 2, p. 489-503, 1995.

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968-75, 2007.

LOBOV, I.B.; RENARD, R.A.; PAPADOPOULOS, N.; GALE, N.W.; THURSTON, G.; YANCOPOULOS, G.D.; WIEGAND, S.J. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3219-24, 2007.

LORENZON, P.; VECILE, E.; NARDON, E.; FERRERO, E.; HARLAN, J.M.; TEDESCO, F.; DOBRINA, A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, n. 5, p. 1381-91, 1998.

LUTZKY, V.P.; CARNEVALE, R.P. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. **The Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1334-50, 2006.

MACDONALD, T.J.; STEWART, C.F.; KOCAK, M.; GOLDMAN, S.; ELLENBOGEN, R.G.; PHILLIPS, P.; LAFOND, D.; POUSSAINT, T.Y.; KIERAN, M.W.; BOYETT, J.M.; KUN, L.E. Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric brain tumor consortium study PBTC-012. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 919-24, 2008.

MUNN, T.Z.; MUES, G.I. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314-5, 1986.

NEWMAN, P.J.; NEWMAN, D.K. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 6, p. 953-64, 2003.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P.L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 366-78, 2010.

OKANO, M.; KUMAMOTO, K.; SAITO, M.; ONOZAWA, H.; SAITO, K.; ABE, N.; OHTAKE, T.; TAKENOSHITA, S. Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 3, p. 1064-70, 2015.

OLIANI, S.M.; CHRISTIAN, H.C.; MANSTON, J.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 9, p. 1429-38, 2000.

OLIANI, S.M.; PAUL-CLARK, M.J.; CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin I expression. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p. 603-15, 2001.

OLIANI, S.M.; PERRETTI, M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1, during experimental inflammatory response. **Italian Journal Anatomy and Embryology**, v. 106, n. 2, p. 69-77, 2001.

OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 5, p. 287-92, 2002.

OLIANI, S.M.; CIOCCA, G.A.; PIMENTEL, T.A.; DAMAZO, A.S.; GIBBS, L.; PERRETTI, M. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Journal of Inflammation Research**, v. 57, n. 10, p. 450-6, 2008.

OLSSON, A.K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signaling - in control of vascular function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 359-71, 2006.

PARK, S.; DIMAIO, T.A.; SCHEEF, E.A.; SORENSON, C.M.; SHEIBANI, N. PECAM-1 regulates the pro-angiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. **American Journal of Cell Physiology**, v. 299, n. 6, p. 1468-84, 2010.

PERRETTI, M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. **General Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 545-52, 1998.

PERRETTI, M.; CHRISTIAN, H.; WHELLER, S.K.; AIELLO, I.; MUGRIDGE, K.G.; MORRIS, J.F.; FLOWER, R.J.; GOULDING, N.J. Annexin 1 is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biology International**, v. 24, n. 3, p. 163-74, 2000.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 25-9, 2004.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effects of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62-70, 2009.

PERROT-APPLANAT, M.; DI BENEDETTO, M. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. **Cell adhesion and migration**, v. 6, n. 6, p. 547-53, 2012.

PIN, A.L.; HOULE, F.; FOURNIER, P.; GUILLONNEAU, M.; PAQUET, E.R.; SIMARD, M.J.; ROYAL, I.; HUOT, J. Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF) induced inhibition of miR-196a expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30541-51, 2012.

RAMJAUN, A.R.; HODIVALA-DILKE, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 521-30, 2009.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins: unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 117, p. 2631-39, 2004.

ROSENGARTH, A.; GERKE, V.; LUECKE, H. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 306, n. 3, p. 489-98, 2001.

RUHRBERG, C.; GERHARDT, H.; GOLDING, M.; WATSON, R.; IOANNIDOU, S.; FUJISAWA, H.; BETSHOLTZ, C.; SHIMA, D.T. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. **Genes & Development**, v. 16, n. 20, p. 2684-98, 2002.

SAINSON, R.C.; HARRIS, A.L. Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 41-51, 2008.

SARIS, C.J.; TACK, B.F.; KRISTENSEN, T.; GLENNEY, J.R.; HUNTER, T. The cDNA sequence for the protein-tyrosine kinase substrate p36 (calpactin I heavy chain) reveals a multidomain protein with internal repeats. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 201-12, 1986.

SAMPEY, A.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. Annexin 1 surface binding sites and their regulation on human fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis & Rheumatology**, v. 43, n. 11, p. 2537-42, 2000.

SENA, A.A.; PROVAZZI, P.J.; FERNANDES, A.M.; CURY, P.M.; RAHAL, P.; OLIANI, S.M. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, n. 10, p. 1260-7, 2006.

SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; VAN DE WATER, L.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. Purification and NH<sub>2</sub>-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea pig tumor secreted Vacular Permeability Factor-1. **Cancer Research**, v. 50, n. 6, p. 1774-78, 1990.

SHEIBANI, N.; FRAZIER, W.A. Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. **Histology and Histopathology**, v. 14, n. 1, p. 285-94, 1999.

SIEKMANN, A.F.; LAWSON, N.D. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. **Cell adhesion & migration**, v. 1, n. 2, p. 104-6, 2007.

SILISTINO-SOUZA, R.; LISONI, F.C.R.; CURY, P.M.; MANIGLIA, J.V.; RAPOSO, L.S.; TAJARA, E.H.; CHRISTIAN, H.C.; OLIANI, S.M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2582-9, 2007.

SOLOWIEJ, A.; BISWAS, P.; GRAESSER, D.; MADRI, J.A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 162, n. 3, p. 953-62, 2003.

SOLITO, E.; DE COUPADE, C.; CANAIDER, S.; GOULDING, N.J.; PERRETTI, M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 2, p. 217-28, 2001.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; BUCKINGHAM, J.C.; MARULLO, S.; PERRETTI, M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1544-6, 2003.

SOLITO, E.; CHRISTIAN, H.C.; FESTA, M.; MULLA, A.; TIERNEY, T.; FLOWER, R.J.; BUCKINGHAM, J.C. Post-translation modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1498-500, 2006.

STATON, C.A.; REED, M.W.R.; BROWN, N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 90, n. 3, p. 195-201, 2009.

SKOBE, M.; ROCKWELL, P.; GOLDSTEIN, N.; VOSSELER, S.; FUSENIG, N.E. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. **Nature Medicine**, v. 3, n. 11, p. 1222-7, 1997.

TAGOE, C.E.; MARJANOVIC, N.; PARK, J.Y.; CHAN, E.S.; ABELES, A.M.; ATTUR, M.; ABRAMSON, S.B.; PILLINGER, M.H. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2813-20, 2008.

TAIMEH, Z.; LOUGHRAN, J.; BIRKS, E.J.; BOLLI, R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 9, p. 519-530, 2013.

TANG, D.G.; CHEN, Y. Q. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22883-94, 1993.

TAKAHASHI, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 12, p. 1785-8, 2011.

TSOPANOGLIOU, N.E.; MARAGOUDAKIS, M.E. Inhibition of angiogenesis by small molecule antagonists of protease-activated receptor-1. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 33, n. 7, p. 680-7, 2007.

TUNG, J.J.; TATTERSALL I.W.; KITAJEWSKI, J. Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. **Cold Spring Harbor**, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2012.

WANG, J.; MILNER, R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins via MAP kinase signalling. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 1, p. 148-59, 2006.

WANG, L.; DUDEK, S.M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. **Microvascular Research**, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2009.

WANG, Z.; DABROSIN, C.; YIN, X.; FUSTER, M.M.; ARREOLA, A.; RATHMELL, W.K.; GENERALI, D.; NAGARAJU, G.P.; EL-RAYES, B.; RIBATTI, D.; CHEN, Y.C.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A.G.; NOWSHEEN, S.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S.S.; HELFERICH, B.; YANG, X.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; CIRIOLO, M.R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; HALICKA, D.; MOHAMMED, S.; AZMI, A.; BILSLAND, A.; KEITH, N.; JENSEN, L.D. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, p. 1-20, 2015.

WEBER, C.; FRAEMOHS, L.; DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 467-77, 2007.

WILLIAMS, S.L.; MILNE, I.R.; BAGLEY, C.J.; GAMBLE, J.R.; VADAS, M.A.; PITSON, S.M.; KHEW-GOODALL, Y. A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3057-63, 2010.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.B.; NOURSHARGH, S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, p. 2514-23, 2007.

YANG, Y.; LIU, Y.; YAO, X.; PING, Y.; JIANG, T.; LIU, Q.; XU, S.; HUANG, J.; MOU, H.; GONG, W.; CHEN, K.; BIAN, X.; WANG, J.M. Annexin 1 released by necrotic human glioblastoma cells stimulates tumor cell growth through the formyl peptide receptor 1. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 3, p. 1504-12, 2011.

YANG, W.; SHIMAOKA, M. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 8, p. 2333-8, 2004.

YI, M.; SCHNITZER, J.E. Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17886-91, 2009.

YOO, Y.S.; KWON, S.M. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, n. 2013, p. 1-11, 2013.

## 8. ANEXOS

---

---

## 8.1. Anexo 1



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Investigação da ação da proteína anexina A1 sobre o processo de angiogênese induzido pelo fator de crescimento do endotélio vascular: modelos experimentais in vivo e in vitro"** (protocolo nº. 073/2013 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Sonia Maria Oliani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 07 de maio de 2013.

## CERTIFICATE

We certify that the research project entitled **"Investigation of action of annexin A1 on the process of angiogenesis induced by growth factor of vascular endothelium: experimental models in vivo and in vitro"** (protocol no. 073/2013 - CEUA), under the responsibility Professor of Sonia Maria Oliani, conforms to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, in meeting 07 de May 2013.

São José do Rio Preto, 07 de maio de 2013.

  
 Profa. Dra. Rejane Maria Goes  
 Presidente da CEUA

*Rejane Maria Goes*  
 17/05/13  
 Rejane Maria

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – STAEPE  
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth  
 CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil  
 Tel 17 3221 2545 fax 17 3221 2500  
 E-mail: [secretaria@ibilce.unesp.br](mailto:secretaria@ibilce.unesp.br) e [ceua@ibilce.unesp.br](mailto:ceua@ibilce.unesp.br)



## 8.2. Anexo 2

<b>INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS/CAMPUS DE SÃO</b>	
---	--

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA PROTEÍNA ANEXINA A1 SOBRE O PROCESSO DE ANGIOGÊNESE INDUZIDO PELO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR: MODELOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO

**Pesquisador:** Jéssica Zani Lacerda

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 15275713.6.0000.5466

**Instituição Proponente:** Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 274.982

**Data da Relatoria:** 13/05/2013

**Apresentação do Projeto:**  
Trata de projeto de pesquisa in vitro (linhagem celular) e in vivo (camundongos) para avaliar o efeito da proteína anexina-A1 na angiogênese.

**Objetivo da Pesquisa:**  
Avaliar o efeito da proteína anexina A1 no processo de angiogênese induzido pelo Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em modelos experimentais in vivo e in vitro.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**  
Não há, pois não se trata de pesquisa em seres humanos, serão utilizados linhagem celular e camundongos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**  
Nada a comentar.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**  
Nada a comentar.

**Recomendações:**  
A pesquisadora deve apresentar o projeto para apreciação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

<b>Endereço:</b> CRISTOVAO COLOMBO 1897/99999	<b>CEP:</b> 15.054-000
<b>Bairro:</b> JARDIM NAZARETH	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO JOSE DO RIO PRETO
<b>Telefone:</b> (17)3221-2456	<b>Fax:</b> (17)3221-2500
<b>E-mail:</b> sorajaf@bioc.unesp.br;	

Página 01 de 02

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 274.992

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nada a relatar.

**Situação do Parecer:**

Retirado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto não se enquadra nos critérios de pesquisas em seres humanos.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 17 de Maio de 2013.

---

Assinador por:  
Ana Elizabete Silva  
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVÃO COLOMBO 1807/99999  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2456 Fax: (17)3221-2500 E-mail: soralatr@bioc.unesp.br,

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Assinatura