

Viviane Polli

**AÇÃO DOS EXTRATOS FOLIARES AQUOSO E
HIDROALCOÓLICO DE *Cissus verticillata* L.
NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS
EM MODELOS DE ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Dias.

Florianópolis, 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Polli, Viviane Aparecida Balvedi
Ação dos extratos foliares aquoso e hidroalcoólico de
Cissus verticillata L. na formação de vasos sanguíneos em
modelos de estudo *in vivo* e *in vitro* / Viviane Aparecida
Balvedi Polli ; orientador, Paulo Fernando Dias ;
coorientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC, 2015.
167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
angiogênese. 3. vasculogênese. 4. *Cissus verticillata*. 5.
estudos *in vivo* e *in vitro*. I. Dias, Paulo Fernando. II.
Maraschin, Marcelo . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

Dedico este trabalho à todos aqueles que compreendem a grandeza do
Universo nos seus mais singelos padrões de manifestação!!!

“ Qualquer caminho é apenas um caminho e não constitui insulto algum – para si ou para os outros – abandoná-lo quando assim ordena o seu coração (...) Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o tantas vezes quantas julgar necessárias... **Então faça a si mesmo e apenas a si mesmo uma pergunta: possui esse caminho um coração?** Em caso afirmativo, o caminho é bom. Caso contrário, esse caminho não possui importância alguma.”

Carlos Castañeda (O Tao da Física)

AGRADECIMENTOS

À Deus, ontem, hoje e sempre... por estar sempre junto a mim e me permitir aprender a cada dia, com cada situação e com cada pequeno passo que dou nesta jornada da vida. Agradeço também por todos os anjos que colocou pra me auxiliar!!!

Aos meus pais e minha família por me ensinarem as verdadeiras bases desta grande árvore da vida: “as raízes”!!! Ainda sou grata por além das raízes, me darem apoio e coragem, acreditando nos meus mais ousados sonhos e projetos e sempre confiando em minhas asas... e que, sempre posso cada vez mais, voar mais longe!!!

Os meus sinceros agradecimentos ao Professor Orientador Dr. Paulo Fernando Dias (BEG-CCB) pela confiança, e por me permitir trabalhar ao seu lado em diversos setores, me permitindo uma visão ampla de todo contexto UFSC. Ao Professor Dr. Marcelo Maraschin, pela orientação, auxílio nos trabalhos fitoquímicos e suporte em discussões e artigos.

Ao Professor Orientador Dr. Marco Presta (UniBS/Brescia/Itália) pela “*Grande Bellezza*” de uma experiência de vida única, recheada de muito aprendizado, humanidade e pelo voto de confiança de toda a sua equipe em futuras colaborações.

Gostaria de agradecer ainda à Prof.^a Dr.^a Cristine Maria Bressan (BEG-CCB) pelo auxílio em todas as fases do projeto e por me mostrar sempre com muita delicadeza e esmero o respeito a cada um, lição rara. À Prof.^a Dr.^a Yara pelo zelo e pronto atendimento a todas as infinitas dúvidas, por todo trabalho e conselhos inestimáveis na etapa pré e pós sanduíche.

Aos meus amigos de laboratório, e por que não dizer família escolhida, conquistados ao longo destes quatro anos de convivência e muito aprendizado como estudantes, pesquisadores, filósofos, cobaias e tudo mais que aqui esqueço de mencionar por lapso de memória. Meu agradecimento muito mais que especial a Daniela Coelho, Lisiê, Giovanni Loss, Fernanda Borba e Susane Lopes!!!!

Também é preciso agradecer imensamente aos amigos encontrados e “colhidos” dos demais setores da UFSC.... Anna e Mauro (meus argentinos favoritos!!!), Rafael Scoz (membro adotado da Farmaco), Maurício (vindo do mundo da bioquímica da depressão), e Yago (mano paraense). Outros tantos amigos que cruzei e visitei em

muitos laboratórios foram essenciais para meu crescimento e caminho... Eder, Sandra, Cintia, Rodrigo, Tici, Val, Marcos, Lucas, Gianni, entre outros. Me perdoem aqueles cujos nomes não foram mencionados. Sou realmente grata a todos.

Um agradecimento especial a minha grande “*Famiglia Bresciana*” pela espetacular acolhida e auxílio (laboratorial e moral) durante todo o processo do estágio. À pesquisadora Dr^a Steffania Mitola por me fazer acreditar em mim mesma, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pelos ensinamentos técnicos nos ensaios de Time-Lapse, CAM, Geltrex[®], quimiotaxia, e por compartilhar sua família e equipe, Giorgia Cremonese, Elizabetta Grillo e Michella Corsini!!! À equipe do pesquisador Dr. Roberto Ronca, Arianna Giacomini e Sara Matarazzo por todo auxílio estatístico, gráfico e de programação, além do compartilhamento de jantares, choros e risos. À equipe do Prof. Dr. Marco Rusnatti, Paola Chiudelle, Antonella e Chiara Urbinati por todo auxílio na execução dos experimentos e pela lição de altruísmo. À equipe do “*Grande Capo*” – Prof. Marco Presta: Mirella, pelo auxílio no ensaio de adesão e cinética; Sara Rezzolla, pelo auxílio na cultura celular com HUVEC, e pelo belíssimo relacionamento que criamos; Chiara Tobia, autoridade no conhecimento do zebrafish, meu muito obrigada ainda pelo grande voto de confiança e amizade; à Giuseppe Paganini, pela doçura e paciência na repetição do ensinamento; Elena, por compartilhar suas dúvidas e nos fazer conhecer juntas um pouco mais do zebra; à Jessica e demais membros da “*Stanza Pesce*”, por toda paciência e grande aprendizado sobre o zebrafish!!!

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Franco Cotteli (*Università di Milano*), pelos aprendizados nos ZEBREMI (*Zebrafish Brescia/Milano Meeting*) e sua Giovanna, por fazer minha estadia em Brescia a mais perfeita e confortável possível, tamanho zelo a mim prestado.

Paralelamente, agradeço a outra grande família que adquiri nestes últimos anos vividos na UFSC – AGEAC (no Brasil e no exterior). Família com a qual a vida me presenteou quando decidi que precisava aprender o caminho do equilíbrio entre o racionalismo e a minha espiritualidade, dando ouvidos ao meu coração. Vocês me permitiram ver o mundo sobre outra perspectiva, me ensinaram que a mudança que quero para minha vida só é possível através da minha própria mudança, através do conhecimento que esta contido dentro de mim mesma. Compartilhando com cada um de vocês, pude compreender o real valor

do ciclo da vida e que o caminho do equilíbrio é realmente fundamental para aqueles que almejam a PAZ...

Meus sinceros agradecimentos aos excelentes Prof.(s) e amigos que construí nestes anos de UFSC, e que me mostraram com seus exemplos a superação em diferentes setores da vida... Michelle, Dina, Cristine, Margherita, Giordano.... Obrigadas por suas palavras sinceras, pelos auxílios, críticas e puxões de orelha, ensinamentos aprendidos, ensinamentos compartilhados, cafés, palavras, risadas e apoio!!!

Minha gratidão eterna aos ensinamentos proferidos pelos meus amigos de uma vida (Leila, o merecimento!!! Ana, o sentido mais sublime da doação!!! Gi, sorriso constante e apoio incondicional!!! Fê, renúncia e fê!!! Ka, o zelo!!! Ju, a espiritualidade!!! Tati, o perfume das flores e os anjos amores!!!! Fontana, companheirismo conterrâneo e perene)... que apesar de distantes fisicamente, sempre me acompanham, guardados no lado esquerdo do peito, e com cujos já dividi apuros, alegrias, angústias, festas, decepções, aventuras, risadas e as melhores coisas da vida.... a simplicidade do cotidiano!!!

Agradeço ainda ao Prof. Dr. Daniel B. Falkenberg e Dra. Rafaela C. Forzza, pelo auxílio prestado na identificação da espécie vegetal. Meu agradecimento a todos os técnicos administrativos pelo auxílio e aos profissionais técnicos dos laboratórios multiusuários do BEG/CCB, sempre dispostos a ajudar.

Meu muito obrigada e mais sublime respeito à mãe Natureza, por me permitir utilizar seus embriões, filhos e partes deles para a realização desta pesquisa.

À CAPES, CNPq e UFSC pelos apoios financeiros.

RESUMO

A formação de vasos sanguíneos compreende processos fundamentais na embriogênese, ocorrendo inicialmente por vasculogênese, seguida por angiogênese. Falhas no equilíbrio fisiológico entre indutores pró- e antiangiogênicos podem contribuir com processos fisiopatológicos, referidos como doenças angiogênicas. Plantas medicinais como o *Cissus verticillata* L., sobre a qual foram reportadas ações antirreumática e antiinflamatória; hipoglicemiante; vasoconstrictora e antimitótica, são utilizadas pela medicina popular, no Brasil. Foram estudados os efeitos dos extratos foliares aquoso (*EACv*) e hidroalcolico (*EHCv*) dessa espécie sobre a formação de vasos, por meio de ensaios *in vivo* (embriões de *Gallus domesticus* e *Danio rerio*; camundongos adultos da espécie *Mus musculus*). E *in vitro* (com células endoteliais da veia umbilical humana-HUVEC). Os resultados mostram a presença de flavonoides na composição dos extratos, e ação antioxidante (29-59%). *In vivo* os extratos, isoladamente ou associados a FGFb ou VEGF-A, retardaram o crescimento dos embriões de *D. rerio* e *G. domesticus*, e nestas espécies inibiram a vasculogênese e a angiogênese nas membranas vitelínica e corioalantóica. Os extratos isolados não inibiram a angiogênese em camundongos adultos, mas nos três modelos a associação de extratos+FGFb ou VEGF-A foi capaz de reverter o efeito angiogênico destes fatores. Em células HUVEC os extratos de *C. verticillata* reduziram a viabilidade celular e o brotamento vascular estimulado por FGFb e VEGF-A. No entanto, a não efetividade sobre mecanismos de proliferação, migração, tubulogênese e modulação de VEGFR2, apontam a necessidade de estudos adicionais para determinação dos alvos moleculares do *EACv* e *EHCv*. É possível concluir que estes inibem vasculogênese e angiogênese embrionária, e que tais ações estariam relacionadas à inibição da viabilidade e ao bloqueio do brotamento angiogênico sobre células endoteliais, bem como à capacidade dos *EACv* e *EHCv* de reverterem a potente atividade de fatores de crescimento angiogênicos, verificados no presente estudo.

Palavras-chaves: Angiogênese, Vasculogênese, *Cissus verticillata*, Célula endotelial de veia umbilical humana (HUVEC), Extratos Aquoso e Hidroalcolico, *Gallus domesticus*, *Zebrafish*.

ABSTRACT

The formation of blood vessels includes fundamental processes in embryogenesis, taking place through the vasculogenesis, followed of angiogenesis. Failures in the physiological balance between pro- and antiangiogenic inducers can contribute to pathophysiological processes referred as angiogenic diseases. Medicinal plants such as *Cissus verticillata* L. have been reported are used in folk medicine in Brazil as antirheumatic, anti-inflammatory hypoglycemic, vasoconstrictor and antimetabolic actions. The effects of aqueous (AECv) and hydroalcoholic (HECv) leaf extracts of *C. verticillata* on the blood vessels formation were studied by assaying *in vivo* (of *Gallus domesticus* and *Danio rerio* embryos as well in adults mice of *Mus musculus*). *In vitro*, assays with endothelial cells from human umbilical vein (HUVEC) experimental models. The findings show the presence of flavonoids in both extracts composition and also an antioxidant action (29-59%). When administered *in vivo* the extracts, alone or associated with FGF or VEGF-A, have slowed the embryonic growth of *D. rerio* and *G. domesticus*, and (in this last species) inhibited vasculogenesis and angiogenesis in the yolk and chorioallantoic membranes. The extracts alone did not inhibited advanced angiogenesis, in *M. musculus* adults, however, in the three animal models the association of extracts + FGFb or VEGF-A was capable to reverse the angiogenic effect of these exogenous growth factors. There was verified a decrease in cell viability and the vascular sprouting as stimulated by FGFb and VEGF-A, in HUVEC. However, the non-effectiveness of important angiogenic mechanisms, such as proliferation and cell migration; tubulogenesis and VEGFR2 receptor modulation, indicate that more studies in order to determine the molecular targets of the extracts remains to be performed. In conclusion, the findings show that the extracts inhibit embryonic vasculogenesis and angiogenesis, and also that such actions are possibly related with decrease of viability and the blockade of angiogenic sprouting on the endothelial cells, as well the capacity of both extracts to reverse the potent activity of angiogenic growth factors, as observed in the present study.

Keywords: Angiogenesis, Vasculogenesis, *Cissus verticillata*, Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Aqueous and Hydroalcoholic extracts, *Gallus domesticus*, Zebrafish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Constituição morfológica de vasos sanguíneos - artérias, veias e capilares.	3
Figura 2 - Formação de vasos sanguíneos pelo processo vasculogênese.....	5
Figura 3 - Moléculas de adesão entre as célula endotelial e o pericito.....	7
Figura 4 - Processos de angiogênese: brotamento e intussuscepção.....	10
Figura 5 - Eventos sequenciais da angiogênese por brotamento.....	15
Figura 6 - Principais fatores ativadores e inibidores da angiogênese	17
Figura 7 - Vias de sinalização que promovem a angiogênese através do VEGF-VEGFR.....	22
Figura 8 - <i>Cissus verticillata</i> L.....	27
Figura 9 – Fluxograma dos ensaios realizados com <i>C. verticillata</i> L.	37
Figura 10 - Desenho esquemático representativo da preparação dos extratos.....	39
Figura 11 - Figura ilustrativa da reação entre anel fenólico e o radical livre DPPH.....	42
Figura 12 - Fotografia da incubadora de ovos e do embrião de <i>Gallus domesticus</i> com o disco de metilcelulose adsorvido na membrana extraembrionária.....	44
Figura 13- Esquema representativo do ensaio de angiogênese no tecido subcutâneo de adultos da espécie Modelo de <i>M. musculus</i>	47
Figura 14 - Embriões de <i>D. rerio</i> em diferentes estágios do desenvolvimento e esquema representativo de sistema vascular na região truncal do embrião.....	49
Figura 15 - Desenho esquemático representativo do isolamento das células endoteliais de veias de cordão umbilical humano.....	53
Figura 16 - Formação dos esferóides e desenho experimental.....	58
Figura 17 - Desenho experimental do <i>Wound-healing Assay</i>	60
Figura 18 - Placa do ensaio μ -slide [®] angiogênese (IBID/Cultrex [®]).....	63
Figura 19 – Desenho esquemático representativo do ensaio da interação biomolecular através de Superfície de Ressonância Plasmática – <i>binding assay</i> e seu respectivo sensograma.....	66
Figura 20 - Fotografias representativas dos discos de metilcelulose implantados na membrana corioalantóica de embriões de <i>G. domesticus</i>	

(E8) na avaliação dos efeitos dos extratos de <i>C.verticillata</i> (<i>EACv</i> e <i>EHCv</i>) sobre a angiogênese	73
Figura 21 - Embriões de Zebrafish tratados no estágio de 75% de epibolia com <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> (10µg/mL).....	79
Figura 22 - Embriões de Zebrafish tratados no estágio de 13 somitos com <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> (0,1 a 10µg/mL).....	80
Figura 23 - Embriões de Zebrafish marcados por hibridização <i>in situ</i> com sondas de RNA de VEGF e Hxl-1 tratados com <i>EACv</i>	81
Figura 24 - Embriões de Zebrafish não injetados e injetados com morfolino de VEGF (VEGFmo) tratados ou não com <i>EACv</i>	82
Figura 25 - Fotografias representativas e gráficos do ensaio de <i>wound healing assay</i>	96
Figura 26 - Figura do experimento de adesão realizado com amostra de <i>EACv</i>	100
Figura 27 - Fotografias demonstrando a fibra do citoesqueleto α -actina de HUVEC tratadas com os extratos de <i>C. verticillata</i>	101
Figura 28 - Fotografias representativas demonstrando as fibras do citoesqueleto α -actina e tubulina, de HUVEC isoladas, tratadas com os extratos.....	102
Figura 29 - Fotografias demonstrando as fibras do citoesqueleto α -actina e tubulina de HUVEC agrupadas, tratadas com os extratos.....	103
Figura 30- Gel de gelatina com 20% leite, ensaio de zimografia.....	104
Figura 31 - Gel do ensaio de <i>Western Blotting</i>	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Conteúdo de flavonoides totais nas amostras dos <i>EACv</i> (A) e <i>EHCv</i> (B) de <i>Cissus verticillata</i>	69
Gráfico 2 - Efeito dos <i>EACv</i> (A-D) e <i>EHCv</i> (E-H) sazonais na vasculogênese e angiogênese da membrana vitelínica de embriões de <i>G. domesticus</i>	72
Gráfico 3 - Efeitos dos extratos na angiogênese da membrana corioalantóica de embriões de <i>G. domesticus</i>	75
Gráfico 4 - Efeito do <i>EACv</i> (10µg/mL) na angiogênese da membrana corioalantóica de embriões de <i>G. domesticus</i>	76
Gráfico 5 - Biometria dos embriões (em E4) submetidos ao ensaio de vasculo-angiogênese na membrana do saco vitelínico (<i>YSM assay</i>).....	78
Gráfico 6 - Avaliação da angiogênese em camundongos adultos - espécie <i>M. musculus</i>	84
Gráfico 7 - Atividade dos <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> sazonais (1 – 100 µg/mL) na viabilidade de células da linhagem HUVEC, após 24h de exposição....	86
Gráfico 8 - Atividade dos <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> sazonais (1 – 100 µg/mL) na viabilidade de células da linhagem HUVEC, após 48h de exposição....	89
Gráfico 9 - Gráfico das análises dos ensaios de brotamento, em gel de fibrina, com VEGF-A e FGFb	92
Gráfico 10 - Gráfico das análises dos ensaios de brotamento, em gel de colágeno, com VEGF-A e FGFb	93
Gráfico 11 - Gráfico do ensaio de tubulogênese	94
Gráfico 12 - Gráfico representativo do ensaio de proliferação com HUVEC primárias, sob influência de VEGF-A.....	95
Gráfico 13 - Gráfico da adesão celular de HUVEC sob diferentes matrizes.....	98
Gráfico 14 - Gráfico da cinética de adesão das HUVEC tratadas com <i>EACv</i>	100
Gráfico 15 - Gráfico da interação de VEGF com KDR e Heparina, sob ação do <i>EACv</i>	105
Gráfico 16 - Temperatura média mensal do ar e precipitação mensal acumulada para os anos de 2011 e 2012, além das normais e médias climatológicas.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito das amostras sazonais dos <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH. (Extrato = 10 mg de massa seca).....	70
Tabela 2 - Efeito das amostras sazonais dos <i>EACv</i> e <i>EHCv</i> (1 – 100 µg/mL) expresso em porcentagem de viabilidade nas HUVEC, nos tempos de incubação de 24 e 48 horas, em relação ao grupo controle 100% de viabilidade).....	88
Tabela 3 - Efeito do <i>EACv</i> de <i>verão</i> (10 – 100 µg/mL) expresso em porcentagem de visualização de eventos nas HUVEC, nos tempos de incubação de 24h.....	91

LISTA DE SIGLAS

ANG: angiopoetina
Akt: *Protein kinase B* (proteína cinase B)
BEG : Biologia Celular, Embriologia e Genética
BHT: *Butylated hydroxytoluen* (hidroxitolueno butilado)
BOT: Botânica
BSA: *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)
CAM: *Chick chorioallantoic membrane assay* (ensaio da membrana corioalantóica de galinha)
eNOS: *endothelial nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase endotelial)
CCA: Centro de Ciências Agrárias
CEUA: Comissão de Ética no uso de Animais da UFSC
COX: cicloxigenase
DLL4: *Delta like ligant 4*
EACv: Extrato aquoso de *Cissus verticillata*
EHCv: Extrato hidroalcolico de *Cissus verticillata*
EGFL7: *EGF-like domain-containing protein 7*
EGFP: *enhanced green fluorescent protein*
EPM: erro padrão da média
ERK: *extracellular signal-regulated kinase* (cinase regulada por sinal extracelular)
FAK: *focal adhesion kinase* (cinase de adesão focal)
FGF: *fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblasto)
FGFR: *fibroblast growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento de fibroblasto)
Flk-1: *Fetal liver kinase 1*
Flt-1: *Soluble fms-like tyrosine kinase-1*
GAG: glicosaminoglicanas
HH: Hamburger e Hamilton
Hlx-1: *H2.0-like homeobox-1 gene*
HIF-1: *hypoxia-inducible factor-1*
HPF: hora pós fertilização
HUVEC: *human umbilical vein endothelial cell* (célula endotelial de veia umbilical humana)
IP3: inositol 3,4,5 trifosfato
JNK: *c-Jun N-terminal kinases*

KDR: *kinase insert domain receptor* (receptor tirosina-cinase tipo III)
LABIOEX :Laboratório de Bioquímica Experimental
LAMEB: Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LEBIMA: Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal
LMBV: Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (proteína cinase ativada por mitógeno)
MMP: *matrix metalloproteinases* (metaloproteinases de matriz extracelular)
Mo: *morfolin* (morfolino)
NRPs: neuropilinas
PAI: *plasminogen activator inhibitor* (inibidor-1 da ativação do plasminógeno)
PBS: *phosphate buffer saline* (tampão salino fosfatado)
PC-PLC: *phosphatidylcholine-specific phospholipase C* (fosfolipase C específica para fosfatidilcolina)
PDGF: *platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaqueta)
PFA: paraformaldeído
PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase* (fosfatidilinositol-3-cinase)
PIP2: *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato)
PKC: *protein kinase C* (proteína cinase C)
PLC: *phospholipase C* (fosfolipase C)
PIGF: *placental growth factor* (fator de crescimento placentário)
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RU: *ressonance units*
SDS - PAGE: sodium dodecyl sulfate – polyacrilamye gel electrophoresis
SFB: soro fetal bovino
SPR: *Superficie Plasmon Resonance*
SU5416: Semaxanib ou SUGEN
SUS: Sistema Único de Saúde
TIMP: *Tecidual inhibitor metalloprotein* (inibidores teciduais de metaloproteínas)
TGF- β : *transforming growth factor- β* (fator de crescimento transformante- β)

TIE: *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like* (Receptor tirosina cinase)

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

UniBS: *Università Degli Studi di Brescia*

UV: *ultra violet (ultra violeta)*

HUVEC: *human umbilical vein endothelial cell*

VE-cadherin: *vascular endothelial cadherin (caderina do endotélio vascular)*

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento vascular endotelial)

YSM: *Yolk sac membrane assay* (membrana vitelínica)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SISTEMA CIRCULATORIO	2
1.2 PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS.....	4
1.3 CÉLULAS ENDOTELIAIS VASCULARES.....	6
1.4 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE – ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS.....	8
1.4.1 Etapa de desestabilização do vaso quiescente.....	11
1.4.2 Etapa de brotamento do novo vaso.....	12
1.4.3 Etapa de ramificação	13
1.4.4 Etapa de estabilização	14
1.5 FATORES INIBIDORES E ESTIMULADORES DA ANGIOGÊNESE.....	16
1.5.1 Família VEGF.....	17
1.5.2 Família FGF.....	19
1.5.3 Famílias PDGF, ANG e TGF.....	20
1.6 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DA ANGIOGÊNESE.....	21
1.7 MÉTODOS DE ESTUDO DA ANGIOGÊNESE.....	23
1.8 PLANTAS MEDICINAIS.....	24
1.8.1 Família Vitaceae e o Gênero Cissus.....	25
1.8.2 A espécie <i>Cissus verticillata</i> (sinonímia <i>Cissus sicyoides</i> L. ou <i>Vitis verticillata</i>).....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS.....	33
4.1 CÉLULAS.....	33
4.2 ANIMAIS.....	34
4.3 ESPÉCIE VEGETAL SOB ESTUDO.....	35
4.4 REAGENTES.....	35
5 METODOLOGIA.....	37
5.1 COLETA DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA...37	
5.2 PREPARAÇÃO DA BIOMASSA E DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>C. verticillata</i>	38
5.3 ENSAIOS.....	40
5.3.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS	40

a. Determinação do conteúdo de flavonoides totais por espectrofotometria por UV	40
b. Determinação da Atividade Antioxidante de <i>C. verticillata</i>	41
5.3.2 ENSAIOS IN VIVO	43
a. Ensaio de vasculo-angiogênese na membrana do saco vitelínico de embriões de <i>G. domesticus</i> (YSM Assay) e análises morfológicas dos embriões	43
b. Ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica de embriões de <i>G. domesticus</i> (CAM assay)	45
c. Ensaio de angiogênese no tecido subcutâneo de adultos da espécie Modelo de <i>Mus musculus</i>	46
d. Ensaios de vasculogênese e angiogênese na membrana do saco vitelínico de embriões de <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	48
1) Hibridização in situ.....	50
2) Microinjeção de morfólino de VEGF	51
5.3.3 ENSAIOS IN VITRO	52
a. Isolamento das células endoteliais de cordão umbilical humano	53
b. Avaliação do comportamento das células endoteliais frente a adsorção em diferentes proteínas de matriz	54
c. Ensaio de adesão celular	54
d. Avaliação da atividade citotóxica	55
e. Ensaio de proliferação celular	56
f. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo	56
g. Ensaio de brotamento de células endoteliais em gel tridimensional de fibrina e colágeno (do inglês, <i>Three-Dimensional Fibrin/Collagen Gel EC Sprouting Assay</i>)	57
h. Ensaio de migração celular pelo método da cicatriz (do inglês, <i>Wound-healing assay</i>)	59
i. Ensaio de motilidade celular	59
j. Avaliação do citoesqueleto por imunocitoquímica	61
k. Ensaio de tubulogênese (<i>μ-slide angiogenesis[®]</i>)	62
l. Ensaio de zimografia	63
m. Análise da fosforilação do VEGFR2 (KDR) e PI3K por <i>Western Blot Analysis</i>	64
n. Ensaio em tempo real da interação biomolecular entre receptores VEGF e <i>EACv</i>. (<i>Surface Plasmon Resonance - SPR - binding assay</i>)	65

5.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
6 RESULTADOS.....	68
6.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E SEU EFEITO ANTIOXIDANTE.....	68
<i>a. Conteúdo de flavonoides totais por espectrofotometria UV.....</i>	<i>68</i>
<i>b. Potencial antioxidante dos extratos de C. verticillata.....</i>	<i>69</i>
6.2 EFEITOS DOS EXTRATOS NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS (VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE) EM MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i>	70
<i>a. Avaliação da vasculo-angiogênese na membrana do saco vitelínico (YSM).....</i>	<i>70</i>
<i>b. Avaliação da angiogênese na membrana corioalantóica (CAM assay).....</i>	<i>73</i>
<i>c. Morfologia e biometria de embriões (E4) de G. domesticus submetidos ao YSM assay).....</i>	<i>77</i>
6.3 EFEITOS DOS EXTRATOS NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS (VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE EMBRIÕES DE <i>D. rerio</i>	79
<i>a. Toxicidade dos extratos de C. verticillata em modelo Zebrafish.....</i>	<i>79</i>
<i>b. Hibridização in situ dos embriões de D. rerio.....</i>	<i>81</i>
<i>c. Análise de morfolinos de VEGF.....</i>	<i>82</i>
6.4 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A ANGIOGÊNESE EM CAMUNDONGOS ADULTOS – ESPÉCIE <i>M. musculus</i>	83
6.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS NA INIBIÇÃO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE IN VITRO.....	85
<i>a. Efeito de amostras sazonais dos extratos de c. Verticillata na viabilidade celular de huvec imortalizadas.....</i>	<i>85</i>
<i>b. Determinação do perfil de morte celular por citometria de fluxo....</i>	<i>90</i>
<i>c. Avaliação do efeito dos extratos sobre o brotamento de HUVEC....</i>	<i>91</i>
<i>d. Avaliação do efeito do EACv na etapa de tubulogênese.....</i>	<i>93</i>
<i>e. Avaliação da proliferação celular de HUVEC sob ação dos extratos.....</i>	<i>94</i>
<i>f. Efeito dos extratos sobre a migração celular de HUVEC.....</i>	<i>95</i>
<i>g. Efeito dos extratos sobre a HUVEC no processo de adesão celular, spreading e cinética.....</i>	<i>97</i>
<i>h. Organização do citoesqueleto de HUVECs por imunohistoquímica.....</i>	<i>100</i>

<i>i. Avaliação da atividade do EACv na fosforilação de receptores da via do VEGF.....</i>	103
<i>j. Avaliação do EACv na interação com receptores de células endoteliais.....</i>	104
<i>k. Atividade dos extratos na atividade enzimática.....</i>	105
7 DISCUSSÃO.....	107
8 CONCLUSÕES.....	120
9 REFERÊNCIAS.....	122
10 ANEXOS	141
ANEXO 1.....	141
ANEXO 2.....	142
ANEXO 3.....	143

1. INTRODUÇÃO

A formação de vasos sanguíneos é fundamental para a homeostasia corpórea atuando em processos fisiológicos. No entanto, um desequilíbrio nesse processo pode desencadear eventos fisiopatológicos caracterizados por doenças angiogênicas, que são processos sustentados por um descontrole na formação de vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1995). As doenças angiogênicas de caráter crônico e inflamatório vem despertando a atenção para o uso de novas estratégias profiláticas e terapêuticas com menor custo se comparadas a abordagens terapêuticas convencionais.

O Brasil, guiando-se por diretrizes internacionais, implantou o uso de terapias complementares, como a fitoterapia, a acupuntura e a fisioterapia, no Sistema Único de Saúde (SUS). Tal política, associada à promoção de pesquisas sobre as plantas medicinais objetiva garantir, além da prevenção de doenças, um menor custo econômico ao paciente e/ou governo, a promoção de uma maior taxa de adesão ao tratamento. O uso correto de medicamentos gera uma melhor qualidade de vida aos indivíduos acometidos por algumas dessas doenças (BRASIL, 2006).

A terapêutica baseada no uso de plantas medicinais é extremamente promissora no nosso país considerando a abundante flora brasileira. A utilização crescente de espécies vegetais como recursos da medicina popular frequentemente sem critérios científicos e o estabelecimento da segurança e eficácia dos extratos acarreta em um entrave na promoção de uma terapia segura e de qualidade para o indivíduo (VEIGA JUNIOR E PINTO, 2005; RODRIGUES et al., 2011). Baseado nisso, o presente estudo propõe investigar características fitoquímicas e medicinais da espécie *Cissus verticillata* L.; considerada um exemplar de planta medicinal utilizada pela população de diferentes regiões do país (especialmente Norte, Nordeste e Sudeste).

O uso tópico e/ou por via oral, na forma de infusão já relatado, mostrar em pesquisas pré-clínicas e clínicas diversas propriedades terapêuticas dessa planta, agindo como antioxidante (KHALIL et al., 2008), antimutagênica, antifúngica e antimicrobiana (BELTRAME et al., 2002), antialérgica (QUÍLEZ et al., 2004), hipoglicemiante e antidiabética, e a ação antiinflamatória (VIANA et al., 2004; LUCENA et al., 2009; XU et al., 2009). Segundo Garcia e colaboradores

(1997) o extrato aquoso dessa planta acabou promovendo uma ação pontual de contração da musculatura lisa isolada de aorta de cobaias, assim como, o uso do extrato hidroalcoólico causou efeitos de embriotoxicidade e malformação congênita, em camundongos.

Os estudos citados sugerem que a maioria das ações referidas convergem para uma provável atividade antiinflamatória dos extratos, cujos mediadores podem, dependendo do contexto, induzir a expressão de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular, o VEGF (KOCH, 1998).

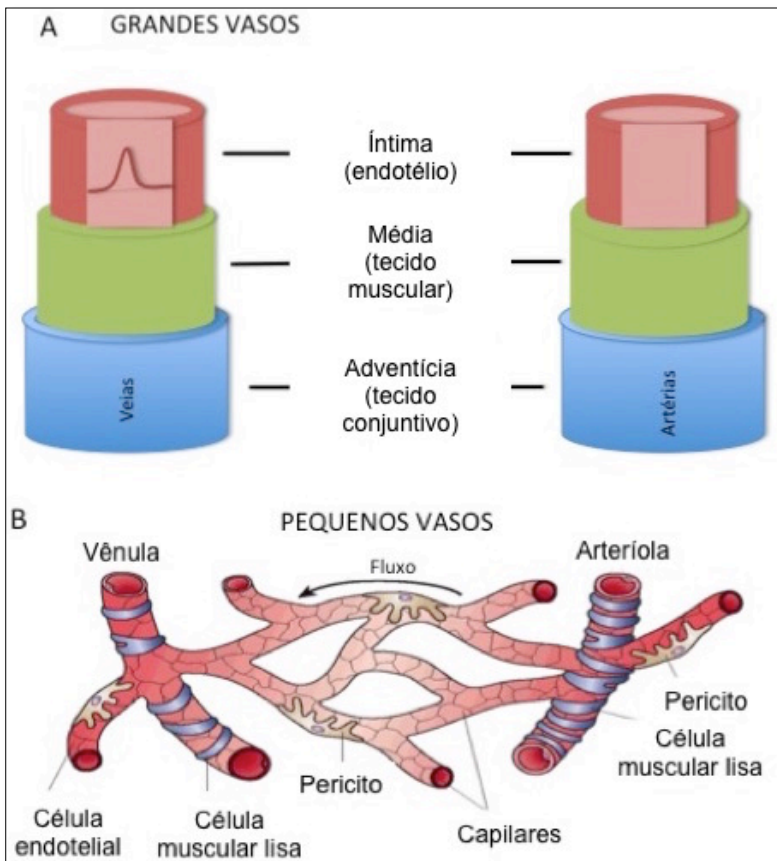
1.1 SISTEMA CIRCULATÓRIO

O sistema circulatório em humanos é composto pelos sistemas vasculares sanguíneo e linfático. Uma das principais características do sistema vascular é a de constituir um sistema circulatório fechado que permite um fluxo constante e unidirecional, por diferentes partes do corpo, através dos diversos componentes do sistema. Já o sistema circulatório linfático tem como característica distinta ser um sistema aberto, com diferenças marcantes na estrutura destes vasos, necessitando desta forma, do auxílio da contração dos músculos esqueléticos para que o fluxo da linfa seja realizado (SADLER et al, 2005).

O sistema circulatório sanguíneo é constituído por diferentes tipos de vasos classificados quanto a sua estrutura, calibre e funcionalidade em artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares (Figura 1). As artérias, vasos de maior calibre (Figura 1 A), originam-se no coração e são responsáveis por transportar o sangue a partir dele para os demais órgãos e tecidos. Estes vasos apresentam uma espessa camada denominada – a íntima elástica. As artérias se bifurcam em vasos de tamanho médio que se ramificam em artérias menores, arteríolas; à medida que penetram nos tecidos, ramificam-se em uma miríade de minúsculos vasos, chamados capilares (SADLER et al, 2005). Os capilares são os vasos de menor calibre, constituídos por células endoteliais aderidas umas as outras formando um tubo, e externamente, suportadas pela lâmina basal e outras células como pericitos e células musculares lisas (TORTORA, 2007). Estes minúsculos vasos se anastomosam e constituem o elo de comunicação entre arteríolas e vênulas (Figura 1B) e apresentam uma grande importância fisiológica, pois realizam o intercâmbio de gases e moléculas entre o sangue e os tecidos corporais. Dos vasos capilares

para as vênulas, uma transição gradual e aumento o calibre acontece para constituir as chamadas vênulas pós capilares. Por fim, das vênulas o sangue é coletado às veias que constituem estruturas de maior calibre, encarregadas do retorno do sangue venoso aos pulmões (TORTORA, 2007).

Figura 1 – Constituição morfológica de vasos sanguíneos - artérias, veias e capilares.



O esquema representa a constituição das artérias e veias (vasos de grande calibre) e os vasos de menor calibre. Os capilares, constituídos basicamente de

endotélio, representam pontes de contato entre arteríolas e vênulas (seta em preto representativa do sentido do fluxo), realizam as trocas gasosas e nutricionais necessárias para o organismo. Fonte: Modificada de Menton e Cleaver, 2003.

Com relação à sua estrutura, cada um desses tipos de vasos são formados por camadas distintas, denominadas túnicas. Elas estão subdivididas em três diferentes estratos: a mais interna (íntima); a intermediária (média), e a mais externa (adventícia). A camada íntima é composta por um epitélio pavimentoso simples de células endoteliais que repousam sobre uma membrana basal com pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo. A camada média é composta basicamente de células musculares lisas (fibras musculares) e matriz extracelular (fibras colágenas), sendo essa a mais variável, e servindo de parâmetro para distinção entre artérias e veias pela sua espessura além da presença de válvulas nas paredes e lúmen dos vasos (MOORE; DALLEY, 2007). Por fim, a camada adventícia, mais externa, possui uma maior espessura e é formada basicamente por tecido conjuntivo frouxo, apresentando fibroblastos, matriz extracelular e em alguns casos uma *vasa vasorum*, ou seja, os vasos dos vasos que auxiliam na nutrição destas camadas (SEMENZA, 2007).

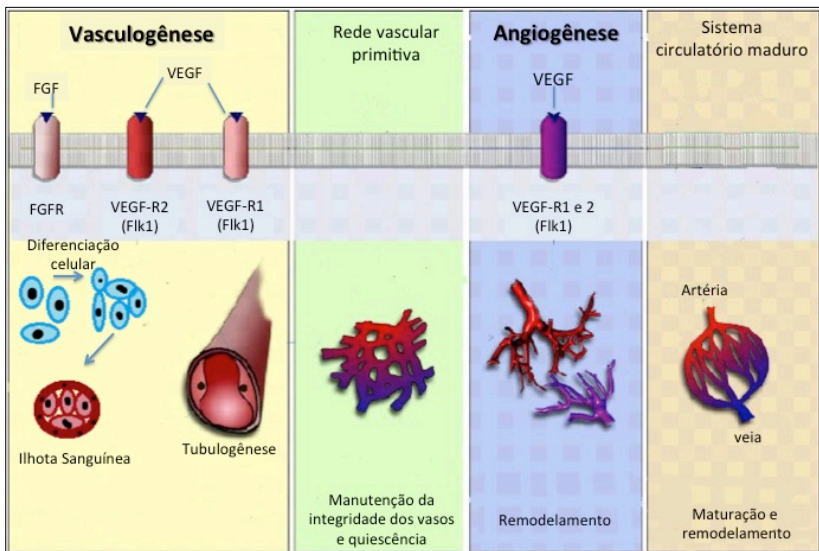
1.2 PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS

Os vasos sanguíneos originam-se de células endoteliais que derivam de células da camada germinativa do mesoderma, a partir do 17º dia do desenvolvimento embrionário humano.

As células mesenquimais quando estimuladas pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2, do inglês, *Fibroblast Growth Factor 2*), em seus respectivos receptores FGFR (do inglês, *Fibroblast Growth Factor Receptor*) sofrem diferenciação em hemangioblastos, precursores das células endoteliais e das células tronco hematopoiéticas. Com o passar dos dias da embriogênese, os hemangioblastos se agregam em ilhotas sanguíneas no mesoderma esplâncnico do saco vitelino, e estimuladas via VEGFR-2 ou Flk1 (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*), por diversos fatores entre eles o VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), se diferenciam em

“vesículas sanguíneas”, que se constituem de duas populações de células distintas. A primeira externa corresponde às células precursoras de fenótipos endoteliais – os angioblastos; e a segunda população, interna, desencadeia fenótipos hematopoiéticos (KUWANO et al., 2001; TIRZIU; SIMONS, 2005; WACKER; GERHARDT, 2011) (Figura 2).

Figura 2 – Formação de vasos sanguíneos pelos processos de vasculogênese e angiogênese.



O esquema representa a formação de vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário. As células do mesoderma (azul) estimuladas por FGF-2, induzem fenótipo precursor mesenquimal – hemangioblastos. Estes, por via do VEGF-R2 se diferenciam em angioblastos: externos (precursores das células endoteliais) e internos (precursores das células sanguíneas). O processo tem seguimento com a tubulogênese, via estímulo de VEGF ao receptor VEGFR-1, até o estabelecimento da rede vascular primitiva. O processo de angiogênese inicia com remodelamento daquela rede, permitindo a maturação e diferenciação dos vasos diferentes tipos. Fonte: próprio autor, baseado em LAMALICE; LE BOEUF; HUOT (2007).

Com a multiplicação rápida do número de células durante o desenvolvimento e aumento na demanda de oxigênio se faz necessário a

indução dos angioblastos para se diferenciarem em células endoteliais originando os primeiros túbulos de capilares sanguíneos (SEMENZA, 2007). Estas novas estruturas tubulares fusionam-se originando a primeira rede vascular ou rede de vasos primordiais (BISCHOFF, 1995), processo conhecido por vasculogênese. Posteriormente, a maturação desta rede primordial vai acontecer por processos, denominados de angiogênese e a arteriogênese, os quais podem ocorrer de uma forma consecutiva ou concomitante (TIRZIU; SIMONS, 2005). É importante salientar que cada um destes processos é estabelecida em fases diferenciadas do desenvolvimento, abrangendo desde o embrião até a fase adulta (FOLKMAN, 1995).

Diferentemente da vasculogênese, a angiogênese é um processo de formação de vasos sanguíneos que ocorre a partir de vasos preexistentes, sendo considerada um processo fisiológico cuja funcionalidade é viabilizar o crescimento, a manutenção e a maturação dos tecidos normais (CARMELIET, 2005).

A arteriogênese refere-se ao processo de remodelamento de uma artéria existente para aumentar o diâmetro luminal em resposta a um fluxo sanguíneo aumentado (HEIL et al., 2006; DEVEZA; CHOI; YANG, 2012; TIRZIU e SIMONS, 2005). Ambos são processos diretamente influenciados, desencadeados e regidos por um criterioso controle de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos (HYDER e STANCEL, 1999; KALKA et al., 2000). Por esta razão, no organismo adulto, os vasos sanguíneos permanecem estáveis e raramente formam novos vasos, excetuando aquela requerida durante o ciclo endometrial do processo reprodutivo feminino, na gravidez, durante os períodos de desenvolvimento pré e pós natal e na regeneração tecidual (FOLKMAN, 1992a; 1995; CARMELIET, 2000_{a, b}; 2003; CARMELIET e JAIN, 2011).

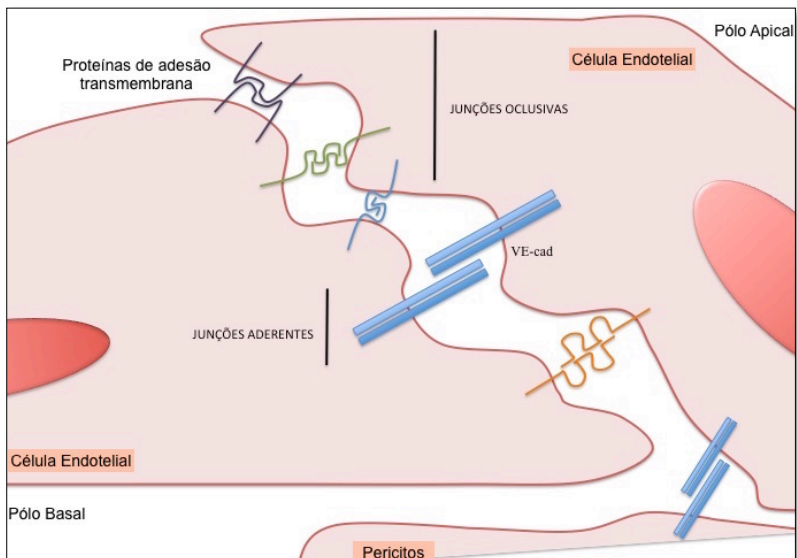
1.3 CÉLULAS ENDOTELIAIS VASCULARES

As células endoteliais são consideradas um tipo de célula epitelial especializada que recobre internamente os vasos sanguíneos. Apresentam morfologia alongada e com estrutura maleável e possuem uma espessura entre 0,1 μm a 1,0 μm , em capilares e aorta, respectivamente (AIRD, 2012). As células endoteliais apresentam-se morfológicamente diferenciadas em vasos de diferentes calibres e possuem ainda características diferentes dependendo do tecido que

irrigam (SIMIONESCU, 1988). Após o estabelecimento da rede vascular madura, as células endoteliais permanecem em repouso, quiescentes ou proliferam em um ritmo muito lento em condições fisiológicas (CARMELIET, 2003). Diferentemente, em condições patológicas, como nas doenças angiogênicas, as células endoteliais passam a proliferar e formar novos vasos de uma forma descontrolada (BISCHOFF, 1995; KUWANO et al., 2001).

Na camada interna dos vasos, as células endoteliais permanecem firmemente unidas entre si por junções do tipo oclusivas e aderentes, e também aparecem unidas as células de suporte subjacentes, às células musculares lisas e aos pericitos, que por sua vez, aderem à membrana basal secretada pelas células endoteliais (Figura 3) (CAVALLARO: LIEBNER:DEJANA, 2006).

Figura 3 – Moléculas de adesão entre as células endoteliais e o pericito.



O esquema representa a adesão entre as células endoteliais e pericitos. As células do endotélio apresentam junções do tipo oclusivas (com proteínas como claudina e nectinas) na região apical e aderentes (representadas especialmente por caderinas) e na região basal apresentam junções aderentes com o pericito. Fonte: Modificada de Dejana 2004.

As principais funções das células endoteliais residem na sua participação nas funções fisiológicas do sistema circulatório e na modulação dos processos de homeostasia, inflamação e de resposta imune (CARMELIET, 2003). Associada a estas funcionalidades, as células endoteliais atuam interagindo morfofuncionalmente com as células circundantes dos vasos e a membrana basal, devido ao alto grau de plasticidade que detecta as mudanças na pressão e no fluxo sanguíneo, interagindo desta forma com o citoesqueleto e a matriz extracelular, e respondendo rapidamente a diversos sinais angiogênicos (CARMELIET, 2003; MAURO; BUSECMI; GERBINO, 2010; ZAHRA, 2014).

Um tipo celular bastante estudado são as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC, do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), linhagem celular comumente utilizada para pesquisas nos campos da Fisiologia e Farmacologia.

As HUVECs são células altamente dinâmicas, que possuem capacidade angiogênica e participação na regulação do tônus vascular, da produção de substâncias como óxido nítrico e prostaglandinas (pelas presença de enzimas eNOS e COX, respectivamente), influenciam o tráfego de células sanguíneas entre o sangue e os tecidos, a manutenção da fluidez do sangue, a permeabilidade celular e imunidade inata e adaptativa (AIRD, 2012; RAZAKANDRAINIBE et al., 2013). Caso estas propriedades sofram uma interrupção ou disfunção, a formação de edemas ou inflamação pode ocorrer (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE – ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS

O termo angiogênese originalmente foi adotado, em 1935, para descrever a formação de vasos sanguíneos (veias) presentes na placenta (DEWITT, 2005). Atualmente, esse termo é utilizado para indicar o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, incluindo o remodelamento da rede vascular primordial e formação de vasos sob condições fisiológicas ou fisiopatológicas, como o câncer (neoangiogênese ou neovascularização) (FOLKMAN, 1992_b; 1995).

Em um contexto fisiológico se verifica uma intensa atividade angiogênica no desenvolvimento embrionário. No adulto este processo ocorre raramente, como por exemplo, no sistema reprodutivo feminino, onde periodicamente a angiogênese esta presente a nível de endométrio durante o ciclo menstrual; também na regeneração tecidual de forma geral, e durante a gravidez na formação da placenta (CARLSON, 2014). Tais episódios são, entretanto, limitados espaço-temporalmente e altamente regulados por fatores como VEGF, FGF, fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF, dentre outros (FOLKMAN, 1992_{c,d}).

A formação ordenada de vasos funcionais é dependente de estímulos determinados oriundos localmente, secretados por células do tecido conjuntivo adjacente, pelas próprias células endoteliais ou de forma parácrina através da circulação sanguínea e da matriz extracelular. Os fatores angiogênicos devem ligar-se aos receptores específicos, na membrana das células endoteliais, desencadear o processo de angiogênese (LIECKENS; CLERCQ; NEYTS, 2001; COULTAS; CHAWENSAKSOPHAK; ROSSANT, 2005) que acontece por breves períodos para em seguida ser completamente inibido, compreendendo a dinâmica de remodelação dos vasos sanguíneos (KUWANO et al., 2001; CARMELIET, 2001_c e 2003).

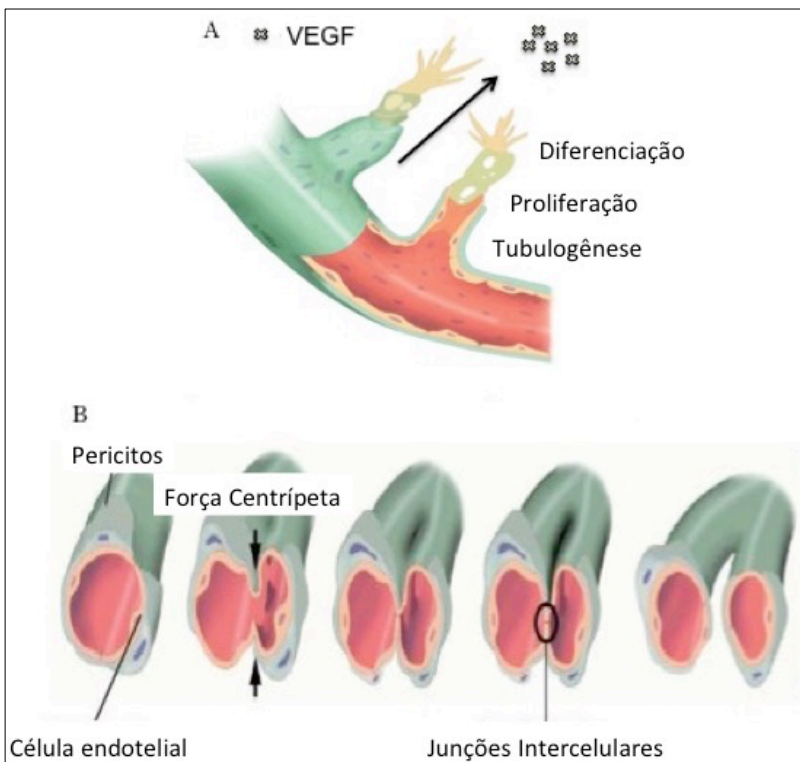
Recebido o estímulo e desencadeado o processo, a angiogênese ocorre na forma de brotamento e/ou por intussuscepção (Figura 4) (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004), contudo, Gibbons (2010) enumera ainda uma terceira forma denominada de crescimento longitudinal, cujo conceito é muito similar ao referido à intussuscepção.

O brotamento é um movimento morfogênético característico da angiogênese que envolve etapas distintas (GIBBONS, 2010). O processo inicia com a estimulação das células endoteliais por meio de sinais pró-angiogênicos (VEGF, FGF, PDGF), segue com a mobilidade das células endoteliais invadindo e degradando a lâmina basal através da formação de filopódios por cordões celulares que se inserem no espaço perivascular da matriz extracelular (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000). A proliferação estabelece uma condição para o processo de tubulogênese, e conseqüente maturação vascular resultando ao final em um novo vaso (PHILLIPS et al., 1991; YANCOPOULOS et al., 2000; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012). O processo de brotamento dura até o cessar dos sinais pró-angiogênicos reestabelecendo a quiescência das células do vaso (Figura 4A) (POTENTE et al., 2011; SIEMERINK et al., 2012). Considerando que a angiogênese por meio de brotamento

(*sprouting*) é o processo mais bem conhecido, trataremos do mesmo empregando o termo angiogênese.

O termo intussuscepção, derivado do latim e cujo significado é “crescendo por si só ou de forma independente” (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000), refere-se ao movimento morfogenético no qual um único vaso, devido à estimulação por pressão e atrito do sangue na parede vascular, ativa as células endoteliais que estendem-se intraluminalmente de forma longitudinal dividindo o lúmen do vaso de forma centrífuga (*i.e.*, do centro para fora), formando dois tubos funcionais (Figura 4B).

Figura 4 – Processos de angiogênese: brotamento e intussuscepção.



Representação esquemática da angiogênese (A) por brotamento e (B) por intussuscepção. Ambas formas de angiogênese permitem um aumento do número de neovasos. Fonte: Adaptado de De Spiegelaere et al., 2012.

Trata-se, portanto, de um processo bastante dinâmico de multiplicação de capilares, por requerer menor proliferação das células endoteliais e uma simplificada remodelação da matriz extracelular, comparativamente, ao que ocorre no brotamento (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004). O crescimento por divisão longitudinal, segundo Gibbons (2010), compreende a divisão das células endoteliais de forma a separar em dois o capilar, criando um novo paralelo ao original.

Nos vasos em formação as células endoteliais alinham-se em uma monocamada onde são interconectadas por junções compostas de moléculas de adesão, VE-caderinas e claudinas, e classificadas como células falangiais, ou “*phalanx cells*”; externamente estas células endoteliais são recobertas por pericitos, cuja função é suprimir a proliferação delas e liberar sinais de sobrevivência celular, como VEGF e angiopoetina - 1 (ANG-1). Em indivíduos saudáveis, as células endoteliais são protegidas de possíveis danos por uma sinalização autócrina de VEGF, ANG-1 e FGF.

A angiogênese pode ser subdividida em quatro etapas distintas.

1.4.1 Etapa de desestabilização do vaso quiescente

O processo de angiogênese tem início quando moléculas de sinalização angiogênica como VEGF, ANG-2, FGFs ou quimiocinas, liberadas em condições de hipóxia, inflamação ou células tumorais, estimulam os receptores, como VEGFR1, VEGFR2, e receptor tirosina cinase TIE1 e TIE2, das células endoteliais de um vaso maduro pré-existente. Em resposta à sinalização pró-angiogênica, os pericitos inicialmente se desprendem das células endoteliais do vaso (Figura 3), responsivos a ANG-2, e libertam-se ainda da membrana basal através da degradação proteolítica mediada pelas metaloproteínases de matriz (MMPs) (Figura 5.1) (FOLKMAN e SHING, 1992a; CARMELIET, 2000_a; CARMELIET e JAIN, 2011).

A exposição das células endoteliais do vaso acarreta na perda de suas junções, e uma consequente dilatação destas células permitindo o crescimento do vaso nascente. O estímulo de VEGF também aumenta a permeabilidade do vaso, acarretando em um extravasamento de proteínas das células e no estabelecimento de uma matriz extracelular provisória. Respondendo a sinalização de integrinas, as células endoteliais aumentadas de tamanho iniciam uma migração para dentro

da nova matriz extracelular, que libera moléculas angiogênicas adicionais nela adsorvidas (VEGF e FGF).

Uma criteriosa regulação dos fatores pró e antiangiogênicos previne que as células endoteliais movam-se massivamente em direção ao gradiente de sinalização. Desta forma, permitem que somente uma - a célula em ponteira ou *tip cell*, seja como uma guia, liderando as demais na presença de fatores como receptores VEGF, neuropilinas (NRPs) e ligantes NOTCH, DLL4 e JAGGED1. As *tip cells*, portanto, iniciam a projeção do cordão celular direcionando-o para um outro microvaso (FOLKMAN, 1992b; FOLKMAN e SHING, 1992_{a,b}; CARMELIET e JAIN, 2011), iniciando a formação de brotamentos capilares (WELSH; WELSH, 2013). Esta etapa é regulada por diversas vias ligadas à ativação da proteína G, como por exemplo, a via do inositol tri-fosfato (IP3) que ativa membros da família Rho (FOLKMAN, 1992b; FOLKMAN e SHING, 1992b; CARMELIET e JAIN, 2011).

A ativação contínua/crônica da proliferação e sobrevivência das células endoteliais promove a formação de estruturas vasculares caóticas, com células endoteliais empilhadas e projetadas em direção ao lúmen vascular, acarretando em vasos sanguíneos anormais (WELSH; WELSH, 2013).

1.4.2 Etapa de brotamento do novo vaso

A segunda etapa inicia quando as *tip cells*, afastando-se da origem do broto, continuam secretando moléculas de adesão possibilitando a contínua migração e proliferação celular. As células endoteliais adjacentes a ela, assumem posições assistentes como as células “suporte” ou *stalk cells* – que também emitem filopódios, porém, em uma quantidade mais reduzida e que são responsivas a NOTCH, WNTs, fator de crescimento de placenta (PIGF) e FGFs. Entretanto, diferentemente dos filopódios emitidos pelas *tip cells*, que simulam um escaneamento do meio e são guiados por efrinas e semaforinas; os filopódios das *stalk cells* liberam moléculas como EGFL7 dentro da matriz extracelular, responsáveis por transmitir as informações espaço temporais às células vizinhas, permitindo que elas estabeleçam uma espécie de tubo suportando a elongação do broto do vaso (Figura 5.2).

A organização hierárquica das células durante o brotamento é acompanhado pela expressão de genes *H2.0-like homeobox-1* (Hlx1) e

pelas moléculas de adesão específicas, as caderinas do endotélio vascular (VE-cad) (XU; CLEAVER, 2011).

A VE-cad é uma molécula proteica transmembrana, específica de células endoteliais que ancora as junções aderentes promovendo adesão célula-célula importante para a diferenciação das células endoteliais (*tip cells*, *phalanx cells* e *stalk cells*) envolvidas no processo de brotamento para formação de vasos (MONTERO-BALANGUER et al, 2009). Já o Hlx-1 nestes subtipos de células endoteliais tem sua expressão restrita, quase que totalmente, delineando o broto do novo vaso, e excluída nas células não angiogênicas adjacentes.

O gene Hlx-1 pertence a subfamília H2.0 de genes homeobox e apresenta-se com homologia de 96,7% ao gene Dbx de camundongo. Recentemente, observou-se que o Hlx-1, cujo potencial *in vitro* reside na sobrevivência das células endoteliais, também é expresso na hierarquia de células endoteliais durante o brotamento dos vasos intersegmentares (HERBERT et al., 2012). Portanto, a expressão deste gene passou a ser utilizada como uma ferramenta para determinar o padrão e eficiência do processo angiogênico, nos vasos intersegmentares e intersomáticos, oriundos da aorta dorsal em *Danio rerio* (HERBERT, 2012).

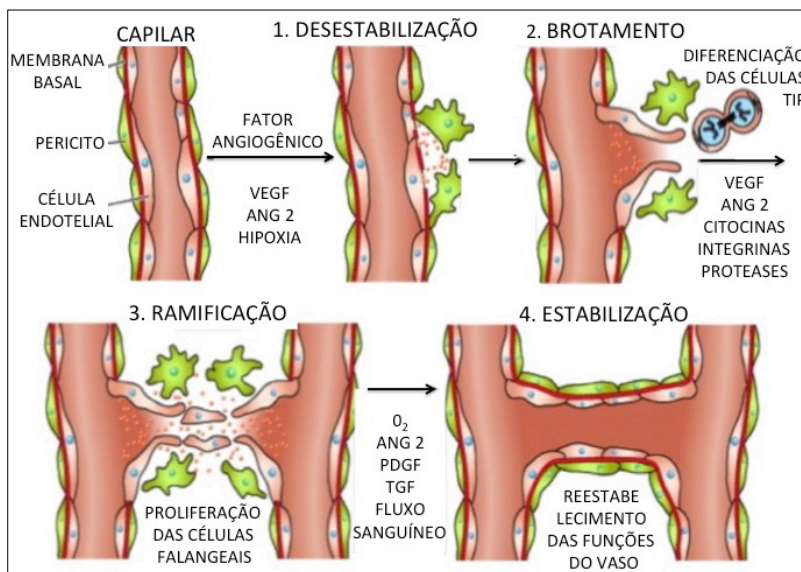
1.4.3 Etapa de ramificação

Na terceira etapa observa-se a participação de outro tipo de células endoteliais, as células conhecidas como "falanges" ou *phalanx cells*. Estas células se alinham em monocamada no interior do novo vaso sanguíneo, em locais onde a proliferação já foi cessada e reconstituem as proteínas de membrana necessárias para adesão. Através de uma indução de hipóxia dirigida pelo fator HIF-1 α , as células endoteliais tornam-se responsivas a sinais angiogênicos, sofrem anastomoses, fusionando-se, com brotamentos vizinhos facilitando a construção de redes vasculares (Figura 5.3). Uma vez formado o broto do vaso, corpos vacuolares/vacúolos apoptóticos são produzidos e iniciam um processo de fusão que organização de um lúmen vascular, o qual será útil para estabelecimento de um fluxo sanguíneo funcional (CARMELIET e JAIN, 2011). Por outro lado, somente o estabelecimento do fluxo sanguíneo não é suficiente para que o vaso seja considerado realmente funcional.

1.4.4 Etapa de estabilização

Essa última etapa se faz necessária para a total funcionalidade dos vasos culminando com sua maturação e estabilização. Eventos como o reestabelecimento da membrana basal, recrutamento de células perivasculares de suporte, pericitos e células musculares lisas vasculares; associados a formação das junções gap (Figura 5.4) contribuem para a estabilização de novas redes vasculares. Os pericitos estão associados principalmente com a maturação de vasos de pequeno calibre (capilares), enquanto que, as células musculares lisas vasculares com vasos de maior calibre como as artérias e veias (HERBERT; STAINIER, 2012). Essa última etapa, também conhecida por tubulogênese é dependente de inibidores teciduais de metaloproteínas (TIMPs) (SIEMENRINK et al., 2012) e inibidor-1 da ativação do plasminógeno (PAI-1) que possibilitam a readesão de pericitos ou células perivasculares lisas. Também regulados por fator de crescimento B derivado de plaquetas (PDGF-B), efrina-B2 e NOTCH sustentam mecanicamente a estabilização do vaso (GABISON et al., 2003; WANG et al., 2010; RUSSIN e GIANNOTTA, 2011). O processo de angiogênese é concluído com o estabelecimento de um novo ramo de vaso funcional e com fluxo sanguíneo contínuo (FOLKMAN, 1992b; CARMELIET e JAIN, 2011).

Figura 5 - Eventos sequenciais da angiogênese por brotamento.



Esquemática dos passos celulares envolvidos na angiogênese. Após o estímulo angiogênico tem início a fase 1 de desestabilização com perda de adesão e degradação da matriz. Em seguida acontece o brotamento (2) com a diferenciação das *tip cells*. A ramificação (3) por conseguinte garante a elongação do broto por proliferação das células acessórias. O processo é finalizado pelo reestabelecimento das funções do vaso (4). Fonte: Modificada de CLAPP et al., 2009.

Conforme descrito acima, a angiogênese requer uma série de etapas sequenciais e/ou interdependentes associadas à alta complexidade do balanço entre fatores pró e antiangiogênicos bem como das suas vias de sinalização envolvidas no processo. A constante sinalização celular e os mediadores químicos liberados em resposta ao estímulo, possibilitam estabelecer uma relação direta entre a fisiologia da formação de novos vasos e a gênese de algumas doenças (KOCH, 1998). Assim, o estudo da relação entre esses processos permitiu o reconhecimento de um grande número de fatores comuns, que modulam a angiogênese fisiológica e fisiopatológica, que culminam em uma inter-relação dinâmica entre suas

vias de sinalização (RISAU e FLAMME, 1995; GLADE BENDER, 2004).

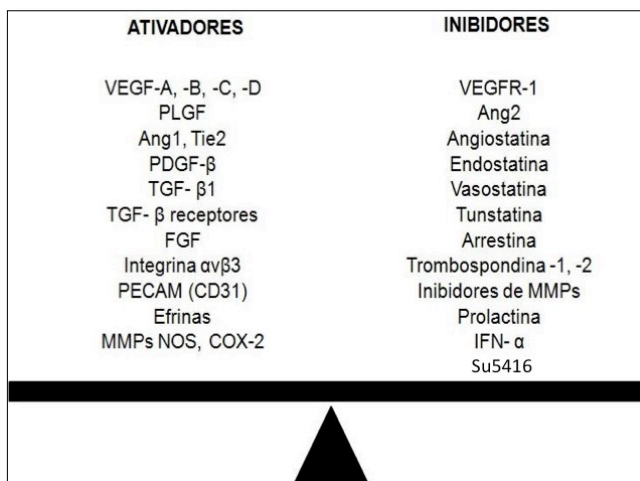
1.5 FATORES INIBIDORES E ESTIMULADORES DA ANGIOGÊNESE

As células de maneira geral requerem diversos tipos de sinalização tanto intracelular, quanto extracelular, para desempenhar suas funções como proliferação, sobrevivência, manutenção e apoptose. De acordo com este preceito também as células endoteliais são influenciadas por moléculas de sinalização para promover o início e dar continuidade ao processo de angiogênese.

Os fatores pró e antiangiogênicos são capazes de influenciar as quatro etapas do processo de angiogênese, acima descritos, de maneira criteriosamente controlada (SAGAR; YANCE; WONG, 2006) através do “gatilho desencadeador”. O gatilho ou interruptor desencadeia a angiogênese gerando um desequilíbrio dos fatores pelo aumento da produção dos sinais pró angiogênicos ou redução dos sinais antiangiogênicos, favorecendo o aumento da rede vascular (MUNDELL; KALLURI, 2007). Também no bloqueio do processo, quando os inibidores estão presentes em excesso ou uma diminuição na produção dos fatores pró angiogênicos indica um bloqueio do processo. Portanto, concluído o estímulo ou inibição, o equilíbrio entre moduladores deve ser reestabelecido (PANDYA; DHALLA; SATANTI, 2006).

Os principais fatores e proteínas que agem no mecanismo de angiogênese estão listados e classificados quanto a sua função na Figura 6, entretanto, é importante considerar que alguns fatores apresentam ação dupla sobre o processo (KUWANO et al., 2001). A classificação que se segue é referente aos fatores clássicos que provocam estímulo ou ativação da angiogênese (família VEGF, PLGF, ANGs, proteínas de adesão, MMPs entre outros) e/ou a inibição desse processo (VEGFR-1, ANG 2, Angiostatina, inibidores de MMPs etc) em uma ou mais das suas etapas.

Figura 6 – Principais fatores ativadores e inibidores da angiogênese



O esquema demonstra a lista dos principais e mais estudados fatores pró e antiangiogênicos. Se a balança pende para esquerda, pelo aumento de ativadores, tem-se acionado o interruptor angiogênico com consequente formação de novos vasos, entretanto, se o deslocamento ocorre para a direita, o processo é inibido. Fonte: Adaptado de Mundell, 2007.

Outra possibilidade de classificação é a que se refere à solubilidade dos fatores. Os fatores insolúveis compreendem as proteínas da matriz extracelular como: laminina, fibronectina e colágeno sendo estes capazes de induzir a organização das células endoteliais em túbulos (RUOSLAHTI e YAMAGUKI, 1991). Já os fatores solúveis como VEGF, FGF, PDGF, se sub-classificam conforme suas propriedades químico-físicas e/ou biológicas; ou ainda dependente de moléculas como o sulfato de heparana (PGHS), no caso do FGF.

1.5.1 Família VEGF

Pertencentes à classificação de fatores proteicos com grande especificidade para células endoteliais, a família dos VEGF foi originalmente purificada por Ferrera e Henzel (1989) e descrita como um fator de crescimento e regulador da permeabilidade vascular. A

família é constituída por somente cinco membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (YANCOPOULOS et al., 2000) e se destacam dos demais fatores angiogênicos pela relevância que apresentam no complexo processo de formação de vasos sanguíneos (NEUFELD et al., 1999).

O VEGF atua, especificamente em HUVEC, aumentando a liberação do cálcio no citoplasma e a permeabilidade celular. Com este aumento na permeabilidade, o processo de proliferação é facilitado, assim como a secreção de uroplasminogênio e proteases, que auxiliam na lise da matriz extracelular (MAHARAJ; D'AMORE, 2007). Ainda em HUVEC estimuladas com VEGF, uma hiperpermeabilidade acarreta no extravasamento para o interstício de proteínas plasmáticas como a fibrina, que formando um gel de sustentação, facilitam o processo de migração celular (NEUFELD et al., 1999).

Cada membro da família VEGF liga-se e responde através de receptores específicos, entretanto, para o processo angiogênico, três tipos de receptores do tipo tirosina cinase estão envolvidos: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk1) e VEGFR-3 (NEUFELD et al., 1999). O VEGFR-1, funciona como um competente sinalizador ancorado a membrana, e pode ainda estar na forma solúvel. Sabe-se que ele auxilia no direcionamento ou inibição do broto do vaso mas sua função precisa na angiogênese ainda é relativamente desconhecida (DVORACK, 1995).

O VEGF (também chamado VEGF-A) é a principal isoforma indutora do processo em nível fisiológico, ou patológico, *in vivo*, e a sua resposta é mediada através da ativação do receptor VEGFR-2 (ou Flk-1) (NAGY et al., 2007; FERRARI, 2009;). A deficiência de VEGF e/ou de VEGFR-2 conduz à interrupção do desenvolvimento vascular. O VEGF, na forma livre, promove aumento da espessura dos vasos, enquanto que as suas isoformas ligadas a matriz estimulam o brotamento e a tubulogênese. O VEGF parácrino é expresso na maioria de tumores modulados por hipóxia, células endoteliais e por macrófagos. Atuando de forma a aumentar a capacidade de brotamento de vasos, o que pode acabar tornando-os anormais. Na forma autócrina, o VEGF liberado pelas células endoteliais, mantém a homeostase vascular e a normalidade dos vasos (WELSH; WELSH, 2013). As *tip cells* em resposta ao gradiente de VEGF fazem uma supra regulação da expressão de DLL4, garantindo que assumam o comando do processo (PHNG e GERHARDT, 2009). O VEGF é considerado, portanto, um potente regulador vascular e sua concentração deve ser altamente regulada

espacial, temporal e quantitativamente para evitar anormalidades, e sua alta especificidade não o impede de atuar em conjunto com demais fatores angiogênicos (YANCOPOULOS et al., 2000; WELSH; WELSH, 2013).

Segundo a literatura, o VEGF-B apresenta efeitos sobre o processo de angiogênese embrionária e também efeitos divergentes na angiogênese patológica, pois além de demonstrar um papel no crescimento de vasos cardíacos causa indução de efeitos adversos como aumento da permeabilidade ou extravasamento do plasma (WELSH; WELSH, 2013). O VEGF-C atua como ligante dos VEGFR-2 e VEGFR-3 e ativa as *tip cells*, também sendo necessário para a formação da vasculatura durante o desenvolvimento embrionário mais tardiamente, e juntamente com as isoformas VEGF-C e VEGF-D, encontra-se envolvido na linfoangiogênese sendo o único receptor expresso nestes subtipos vasculares (CHUNG; FERRARA, 2010). Em estudos com peixe-zebra, onde a primeira veia embrionária surge por segregação celular de endotélio venoso, a partir de um precursor comum, a diferenciação em células endoteliais é restringido pelo VEGFR-2, mas promovida pelo VEGFR-3 (FERRARA, 2010). Dessa forma podemos afirmar que o VEGF tem uma significativa contribuição não somente para os processos fisiológicos mas também para angiogênese patológica, como no exemplo do câncer.

O fator de crescimento placentário (PIGF), um homólogo do VEGF, contribui para o interruptor angiogênico crucial em numerosas doenças (CARMELIET et al., 2001; BOCK; CAUWENBERGHS; CARMELIET, 2011). O PIGF estimula o crescimento de novos vasos pelo recrutamento de monócitos no microambiente vascular e também porque ao competir com o VEGF-A pelo receptor VEGFR-2 e VEGFR-1, estimula diretamente o crescimento de células endoteliais e células musculares lisas.

1.5.2 Família FGF

A superfamília FGF e seus respectivos receptores não são sinais específicos apenas do endotélio, durante o processo de vascularização (MOSCATELLI, 1987). Seus membros de maior destaque são o FGF-1 (ácido) e FGF-2 (básico), porém ao menos outros 20 isotipos já são conhecidos (ITOH et al., 2004). O FGF-1 é um fator importante para

manutenção da integridade vascular e a baixos níveis inibe os FGFR nas células endoteliais quiescentes causando a desintegração dos vasos (RUSNATI et al., 2005).

O FGF-2 foi o primeiro fator angiogênico descoberto e tem sua atividade angiogênica atribuída à ativação de receptores de tirosina cinases (BIKFALVI et al., 1997) das células endoteliais ou indiretamente, por induzir a liberação de fatores de outras células (BIKFALVI et al., 1997). O desempenho de sua ação esta intimamente atrelado a forma com que se encontra na matriz extracelular. Quando ligado a moléculas de glicosaminoglicanos (GAGs) na matriz extracelular, como o PGHS (YAYON et al., 1991), promove degradação e aumento na liberação de moléculas de FGFb no microambiente vizinho. Além disso, outro papel de destaque das proteoglicanas, é que podem aumentar significativamente a afinidade do FGFb pelo seu respectivo receptor (NUGENT; IOZZO, 2000).

A ação do FGF na angiogênese pode envolver tanto as fases iniciais, quanto as fases mais tardias de maturação do vaso (PRESTA, 2005). Ele age na primeira, através da produção de proteases, que culminam na degradação da matriz extracelular ou nas moléculas de adesão desencadeando os mecanismos de migração e proliferação (PRESTA, 1999). E na fase de estabilização pode agir também sobre as moléculas de adesão, na matriz extracelular e no recrutamento de pericitos, conduzindo a morfogênese e maturação do vaso (RUSNATI et al, 2005).

1.5.3 Famílias PDGF, ANG e TGF

Outras famílias de moléculas estão envolvidas no estabelecimento da funcionalidade dos vasos como as do PDGF, da ANG e fator de crescimento transformante (TGF).

O PDGF atua na regulação do crescimento e divisão celular, e tem um papel crucial na angiogênese. Na isoforma β , é importante para estabilizar a elongação dos túbulos, e na estabilização de vasos sanguíneos primários através do recrutamento de pericitos (POTENTE et al., 2011). Embriões desprovidos de PDGF- β exibem fragilidade vascular, vasodilatação, perda sanguínea com perfusão defeituosa e hipóxia (HELLSTROM et al., 2001).

As ANG são compostas por quatro isoformas de ligantes (1 a 4), capazes de se ligar a dois tipos de receptor TIE (TIE-1 e TIE-2). Na presença de estímulo angiogênico, as células endoteliais do brotamento liberam ANG-2, os quais antagonizam ANG-1, auxiliando no destacamento delas e das células murais, na permeabilidade vascular e no brotamento das células endoteliais (SIEMERINK et al., 2012). A ANG -1 atua na estabilização da parede dos vasos sanguíneos fornecendo organização dos eventos específicos de remodelação vascular e maximiza a interação entre células endoteliais, as de células suporte e a matriz extracelular (SURI et al., 1996; SIEMERINK et al., 2012). A ANG-2 parece ser requisitada em eventos de remodelação vascular promovendo desestabilização da vasculatura (YANCOPOULOS et al., 2000). Convém ressaltar que a expressão e atividade de fatores angiogênicos tais como a ANG-1, têm grande variação nos diferentes tecidos (CARMELIET, 2003), assim como a produção de ANG-2.

O TGF apresenta-se como TGF-alfa e TGF-beta, e apresenta função crítica na regulação e no desenvolvimento de mamíferos. O TGF-beta, especialmente, apresenta-se na forma latente, devendo ser ativado para desempenhar sua atividade biológica na regulação de processos como proliferação, sobrevivência e degradação da matriz extracelular. A ativação depende não somente de um microambiente ácido como também de plasmina e trombospondina. O TGF- β 1 apresenta efeitos variados nas células endoteliais vasculares, como por exemplo, *in vivo*, induzindo a angiogênese; e *in vitro*, inibindo a proliferação, migração e atividade proteolítica, e a indução da apoptose, importante componente do processo de formação de vasos (Ferrari, et al., 2009). Em baixas as concentrações, o TGF- β 1 contribui para a angiogênese através da expressão de fatores pró-angiogênicos e proteinases; contudo, em altas concentrações, o TGF- β 1 inibe o crescimento de células endoteliais (CARMELIET, 2003).

1.6 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DA ANGIOGÊNESE

A angiogênese pode ser desencadeada por diferentes mecanismos que envolvem os fatores angiogênicos acima relacionados e seus

respectivos receptores, bem como um grande número de proteínas efetoras, como PI3K (também conhecida como AKT) e ERK.

A ERK atua na migração e proliferação das células endoteliais, enquanto que a PI3K, ativada via VEGF-A, tem sido relacionada à formação de estruturas tubulares *in vitro* pelas células endoteliais e, na proliferação, sobrevivência e permeabilidade vascular (Figura 7).

A Akt, por sua vez, consiste numa molécula intermediária da sinalização após a ativação de PI3K, sendo um elemento de considerável importância na regulação da célula endotelial pelo VEGF (WELSH; WELSH, 2013).

Figura 7- Vias de sinalização que promovem a angiogênese através do VEGF VEGFR.

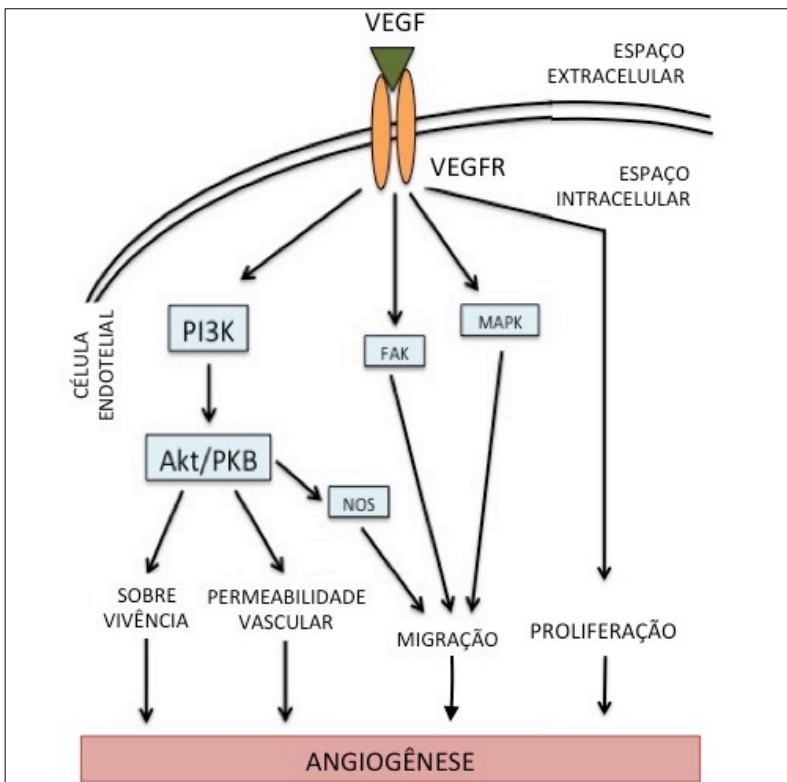


Figura demonstrando os principais mecanismos e proteínas envolvidas na cascata de sinalização da angiogênese pelo VEGF (ligante) e seu receptor VEGFR.

Por fim, o receptor VEGFR-2 exerce uma importante ação na mitose e permeabilidade de células endoteliais. A ativação desse receptor contribui para a fosforilação de múltiplas vias de sinalização que incluem ERK (MAPK), JNK, PI3K e Akt que subsequentemente promovem a proliferação, a migração e a tubulogênese de células endoteliais (FERRARA et al., 2003).

Portanto, visualizando o cenário da formação de vasos e objetivando contemplar as quatro etapas do processo angiogênico, diferentes metodologias complementares foram utilizadas na tentativa de responder as diferentes questões surgidas no decorrer deste estudo.

1.7 MÉTODOS DE ESTUDO DA ANGIOGÊNESE

Os modelos de estudo da angiogênese se subdividem em 3 grandes grupos, quanto a natureza do ensaio: *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (HASAN, 2004; CIMPEAN; RIBATTI; RAICA, 2010). Os modelos *in vitro* permitem estudar e avaliar a capacidade de diversas moléculas induzirem o fenótipo angiogênico, a morfogênese de células endoteliais, a possibilidade de mensuração dos movimentos celulares (migração e quimiotaxia), a migração direcionada (quimiotaxia), a proliferação, apoptose e a produção de proteases após a estimulação com fatores angiogênicos (Folkman e Schild, 1980).

Os ensaios *in vivo* abrangem diferentes ensaios em distintos modelos animais, como o implante subcutâneo de hemostático Gelfoam® ou do plug de Matrigel®, realizados em *Mus musculus*; os ensaios das membranas vitelínica (YSM) e córioalantóica (CAM) em *Gallus domesticus* (McCORMICK, 1984; CHAPMAN, 2001; STATON et al., 2004); e em *Danio rerio* é possível acompanhar todo o desenvolvimento da formação de vasos, além de permitir o estudo de diferentes fenótipos e genes envolvidos (NICOLI; PRESTA, 2007; TOBIA et al., 2013).

Ensaio *ex vivo* também são utilizados para a realização dos estudos da angiogênese, como por exemplo, os anéis aórticos de camundongos que visam uma avaliação da tubulogênese. Portanto,

sendo o processo angiogênico altamente complexo, com o envolvimento de diferentes tipos celulares é recomendado que as pesquisas envolvam pelo menos dois destes tipos de modelos. Para a realização desta tese optou-se pela realização de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

1.8 PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais são conceituadas como o vegetal no todo ou parte, apresentando na sua composição moléculas cuja empregabilidade se faz útil para fins terapêuticos preventivos e curativos (OMS, 2000). Muitas destas moléculas e/ou precursores químicos encontram-se amplamente utilizados como ferramentas terapêuticas e/ou como medicamentos na medicina popular, tradicional e na fitoterapia (AMOROZO, 2002).

O aumento na utilização deste tipo de terapia, no mundo ocidental, demonstra uma grande aceitação pela população e pela comunidade médica e científica, da eficiência e eficácia destes produtos. A forma alternativa de tratamento frente aos recursos terapêuticos alopáticos, compreende uma fonte natural de princípios ativos, como aqueles aplicados na Medicina Tradicional Chinesa, podendo inclusive contribuir para descoberta de protótipos moleculares para novos fármacos, como muitos dos existentes no mercado (CECHINEL e YUNES, 1998).

Muitas pesquisas apontam, inclusive as desenvolvidas em nosso grupo para ações inibitórias ou estimulatórias de produtos naturais sobre a formação de vasos sanguíneos (DIAS et al., 2005; CHEN et al., 2007; DIAS et al., 2008a; UDENIGWE et al., 2008; MENEGHELLI et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Muitos destes compostos atuam em diferentes processos, como na inibição da proliferação de células neoplásicas, inibição de vias de sinalização de fatores de crescimento, na indução de apoptose, bem como na inibição da formação de vasos sanguíneos, auxiliando no tratamento de distúrbios angiogênicos (DORAI E AGGARWAL, 2004; DULAK, 2005).

Os efeitos observados a partir do uso de compostos naturais na atividade angiogênica parecem se relacionar aos constituintes químicos, que exercem suas ações seja de forma sinérgica ou isolada. Análises em larga escala de *screening* de extratos têm sido realizadas em países como Índia e China, cuja sabedoria milenar das plantas medicinais se faz

presente até os dias atuais, visando suprir a necessidade de se identificar novas drogas em potencial, além de promover seu espectro toxicológico e a garantia de qualidade do produto, ou a sua produção (JAYARAMAN, 2014). No Brasil, inúmeras das plantas com propriedades medicinais carecem de maiores avaliações fitoquímicas, que comprovem a sua eficácia (CALIXTO, 2005).

A escassez de estudos em plantas medicinais com potencial para atuar no processo angiogênico e/ou nas doenças angio-dependentes, associada à utilização segura, sem risco potencial e toxicidade, evidenciam um ponto crítico do uso e consumo destas plantas, que pode inclusive acarretar riscos para saúde, a exemplo da citotoxicidade, e/ou para a vida, a exemplo da embriotoxicidade (FOTSIS et al., 1997).

1.8.1 Família Vitaceae e o Gênero Cissus

Constituída de 12 gêneros e cerca de 800 espécies, a família Vitaceae apresenta-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais (SOUZA e LORENZI, 2005). No Brasil, esta família é representada pelo gênero *Cissus* com 42 espécies descritas (LOMBARDI, 1995).

Os representantes da família Vitaceae são frequentemente cultivados como trepadeiras ornamentais além do seu extensivo uso como planta medicinal (SOUZA e LORENZI, 2005) e tem como seu representante mais ilustre a videira. O vegetal pertencente ao gênero *Cissus* (L.) (*C. verticillata*) é representado por arbustos sarmentosos, nodosos, râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (CORREA, 1926; BERG, 1993; LOMBARDI, 1995).

Algumas espécies de *Cissus*, como por exemplo o *Cissus verticillata*, se destacam por estudos que demonstram as atividades biológicas desempenhadas por elas, como: atividade antimicrobiana e antiinflamatória (BELTRAME, 2001; 2002), efeitos neurofarmacológicos (VISWANATHA SWAMY, 2006; SILVA et al., 2007), efeito antioxidante (SILVA et al., 2007), efeito inibidor enzimático (BARBOSA-FILHO et al., 2006) e ação notadamente hipoglicemiante associada à atividade antidiabética (BARBOSA et al., 2002).

1.8.2 A Espécie *Cissus verticillata* (sinonímia *Cissus sicyoides* L. e *Vitis verticillata*)

A espécie *C. verticillata* (Figura 8) é popularmente conhecida como anil-trepador, cipó-puçá, insulina-vegetal e uva-brava, além de outras denominações (CORREA, 1926; BERG, 1993). É particularmente empregada como antirreumático e na cura de abscessos. A infusão de suas folhas e do caule é utilizada na inflamação muscular e também possui uma atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA et al., 2002; SANTOS et al., 2008; SALGADO, MANSI e GAGLIARDI, 2009).

Os extratos de diferentes partes da planta foram estudados, bem como compostos isolados delas, mostrando que o extrato aquoso bruto apresentou efeito vasoconstrictor nos anéis aórticos, de porcos da Índia (BELTRAME et al., 2002), efeito antimitótico demonstrado por Sáenz e colaboradores (2000) nas células de *Allium cepa* e ainda, sugere-se, efeito hipoglicemiante e anti-lipêmico, segundo os resultados encontrados por Viana e colaboradores (2004). Demais efeitos como a ação antiinflamatória, antiepilética, anti hipertensiva (BELTRAME et al., 2001), antigripal, contra infecções respiratórias (AGRA, FREITA & BARBOSA-FILHO, 2007), problemas urinários e de indigestão (FERREIRA et al., 2008) também foram comprovados.

Figura 8. *Cissus verticillata* L.

Fotografias de partes aéreas da planta da espécie *Cissus verticillata*: folhas, frutos e inflorescências (A); inflorescências de coloração amarelada (B); folha típica com contorno ovalado (C); figura demonstrando os frutos maduros (coloração roxa) e verdes (D); presença de gavinhas (E). Fonte: Próprio autor.

Poucos estudos toxicológicos com esta espécie foram encontrados na literatura. O ensaio clínico, em camundongos, com o extrato hidroalcolólico das folhas de *C. verticillata* mostrou alterações das enzimas relacionadas às funções hepáticas, como as transaminases e fosfatase alcalina (VASCONCELOS et al., 2007). Almeida (2007) demonstrou embriotoxicidade pelo uso da fração hidroalcoólica das folhas de *C. verticillata*, e malformações fetais, como ausência da cauda e extrusão das vísceras abdominais (gastrosquise). Entretanto a taxa de fertilidade não foi afetada em camundongos fêmea em decorrência do uso dos extratos (ALMEIDA, 2007).

Estudos de bioatividade identificaram no *C. verticillata* (L.) a presença de: compostos terpenóides (BELTRAME et al., 2002), magnésio, fósforo, cálcio e potássio (SALGADO, MANSI e GAGLIARDI, 2009), esteróides, quinonas e compostos fenólicos,

destacando os flavonoides, (VIANA et al., 2004) e o estilbeno resveratrol (LUCENA et al., 2009), além de saponinas e mucilagem (SILVA et al, 1996). Parte da constituição fitobioquímica da espécie foi recentemente estudada por Xu e colaboradores (2009), revelando ainda a presença de novos compostos da classe dos flavonoides e alcalóides.

Apesar da planta ser utilizada pela população na cura e/ou prevenção de diversas doenças, poucos estudos comprovam realmente os efeitos da “insulina vegetal” e de seus constituintes (BARBOSA et al., 2002) sobre condições fisiológicas e patológicas.

As propriedades biológicas, farmacológicas e toxicológicas de *C. verticillata* apontam para a importância da realização de estudos sobre os potenciais efeitos destes extratos na formação dos vasos sanguíneos. Desde que o *C. verticillata*, uma fonte natural de princípios ativos antioxidantes, apresenta propriedade antiinflamatória, hipoglicêmica, vasoconstritora, associado ainda ao efeito embriotóxico em embriões de camundongos (CHEN et al., 2007), o presente trabalho pretende verificar se esses extratos poderiam atuar como um agente anti-angiogênico.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais constitui uma prática comum na medicina popular em vários locais do mundo (CAPASSO et al., 2000). Essa prática pode ser realizada pelo uso de diversas preparações farmacêuticas e neste trabalho foi escolhido uma das mais comuns: extratos. Embora pesquisas busquem isolar os componentes ativos de extratos de planta medicinal o efeito apresentado ocorre possivelmente pela sinergia entre os diversos compostos ali presentes (MACIEL et al., 2002).

Diversas atividades biológicas de extratos de *C. verticillata* foram relatados, como o de vasoconstrição, atividade hipoglicemiante e embriotoxicidade. No entanto, nenhum estabelece uma relação entre os efeitos do extrato com o seu potencial antioxidante sobre a vasculo-angiogênese fisiológica, que tem íntima relação com muitas doenças angiogênicas. Portanto, cabe investigar o efeito dos extratos sobre a angiogênese, considerando que este processo pode estabelecer novas relações com as atividades biológicas consideradas acima.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos dos extratos aquoso (*EACv*) e hidroalcoólico (*EHCv*) de *Cissus verticillata* L. sobre a vasculo-angiogênese e as etapas dos processos de formação de vasos sanguíneos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química dos extratos aquoso e hidroalcoólico quanto a presença de flavonoides totais e a sua capacidade antioxidante, nas diferentes estações do ano de 2012;
- Investigar com base em ensaio de viabilidade, a citotoxicidade dos extratos sobre a linhagem de células endoteliais de veias do cordão umbilical humano (HUVEC);
- Analisar, *in vivo*, o efeito dos extratos na formação de vasos iniciais (vasculo-angiogênese) em embriões de *Gallus domesticus*;
- Comparar, *in vivo*, as características morfológicas e o comprimento céfalo-caudal (biometria) entre embriões de *Gallus domesticus* tratados e não tratados com os extratos sob estudo;
- Analisar o efeito dos extratos sobre a angiogênese em animais adultos da espécie *Mus musculus*;
- Avaliar, *in vivo*, a ação dos extratos sobre a formação dos vasos primordiais de embriões de *Danio rerio*, e a possível embriotoxicidade dos extratos nessa espécie animal;

- Avaliar, *in vitro*, a ação dos extratos sobre eventos ou mecanismos celulares, relacionados ao processo de angiogênese;
- Investigar a possível atividade moduladora dos extratos, sobre a via do receptor angiogênico VEGFR2.

4 MATERIAIS

4.1 CÉLULAS

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando-se dois tipos de células endoteliais, pertencentes a linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e as derivadas de cultura primária. As células HUVEC imortalizadas foram utilizadas nos experimentos conduzidos na UFSC/SC/Brasil, adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro; e as de cultura primária foram utilizadas nos experimentos conduzidos em Brescia/Itália, isoladas do cordões umbilicais doados. As HUVEC de linhagem foram rotineiramente crescidas até confluência em meio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com 5% SBF (Gibco, Grand Island, NY), 1% de estreptomicina e penicilina (100 unidades/ml), 1% L-glutamina (200 mM), 4,5 g/L D-glicose e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio. Foram cultivadas em placas de poliestireno específicas para cultura celular e mantidas em atmosfera umidificada em estufa condicionadora suplementada com 5% de CO₂ à 37° C.

As HUVEC primárias foram isoladas da veia de cordão umbilical humano, segundo protocolo modificado descrito por Maruyama (1963), de cordões doados e provenientes do setor de obstetrícia, do Hospital Civil de Brescia (*Ospedale Civile di Brescia*), sob aprovação de comitê de ética (IRBs) da *Facoltà di Medicina da Università Degli Studi di Brescia* (UniBS). As HUVEC foram rotineiramente cultivadas até atingir uma confluência acima de 80%, em meio M199 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado a temperatura de 30 à 56°C (SBF) (Gibco, Grand Island, NY), 3% de suplemento para crescimento de células endoteliais (SCCE) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) ou extrato de cérebro bovino (100 µg/mL), 1% de estreptomicina e penicilina (SP - 100 unidades/ml), 25 mg de heparina; e mantidas em atmosfera umidificada em estufa condicionadora suplementada com 5% de CO₂ à 37° C. Este meio no decorrer da tese é também nomeado de meio M199 completo e variações deste, no presente estudo, foram utilizadas dependendo do ensaio utilizado, para melhor obtenção da resposta celular. As HUVEC foram usadas em passagens iniciais (P1–P4) em todos os experimentos; e

cultivadas e/ou mantidas em superfície plástica cobertas por solução de gelatina a 1,5% (Sigma), exceto para aqueles ensaios onde diferentes matrizes foram testadas e no ensaio de brotamento, que não necessita de tal procedimento.

4.2 ANIMAIS

Ovos fertilizados de galinha doméstica (*Gallus domesticus*) da linhagem Ross, fertilizados foram utilizados para a realização dos experimentos, *in vivo*, para avaliação da formação de vasos embrionários. Os mesmos foram obtidos por doação da indústria avícola Tyson® do Brasil, sediada no município de São José- SC, Brasil. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA) - UFSC.

Camundongos Swiss adultos fêmeas, pesando em média 20 ± 2 g, isogênicos da linhagem Balb/C (*Mus musculus*); com idade aproximada de 60 dias, foram obtidos a partir de reprodução controlada no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) e do Biotério Experimental de Mamíferos Roedores (Cadastro: BIO054) e mantidos em condições de temperatura e umidade padronizadas, acesso a ração e água *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Os ensaios foram realizados no LEBIMA, UFSC.

Os embriões de zebrafish *wild type* e transgênico *tg* (fli 1/KDR/VEGFR2: *enhanced green fluorescent protein* [EGFP]; e *tg* flt 1/VEGFR1) utilizados nos experimentos foram gerados, segundo protocolo padronizado pela comunidade científica (Westerfield, 1995), nos aquários da Faculdade de Medicina e Cirurgia da *Università degli Studi di Brescia*. No momento da reprodução, um macho e uma fêmea foram colocados no mesmo aquário dotado de um aparato plástico que permitiu a passagem e deposição dos ovos no fundo do tanque. Os animais foram alojados em fluxo multi-tanque (Tecniplast®) de água doce com capacidade de 3-5 litros cada e mantidos em condição ótima de temperatura (28°C), pH (7,2 - 7,4), condutividade (500 - 1000 μ S) e parâmetros bioquímicos como, alcalinidade e compostos nitrogenados e incluindo o arejamento contínuo, filtração e reposição de água diária (10% do volume total em circulação). Os peixes foram alimentados 3 vezes ao dia com nauplius de *Artemia* e ração granulada e submetidos a um ciclo de iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 14/10 horas,

respectivamente. Os embriões foram mantidos em água de manutenção para embriões, também chamada água peixe. Para o preparo de um litro de água deionizada adiciona-se 0,1 g de bicarbonato de sódio; 0,1 g de *instant ocean*; 0,19 g de sulfato de cálcio. Após autoclavagem adicionou-se azul de metileno (todos Sigma, St. Louis, MO).

Todos os procedimentos para evitar o estresse e sofrimento dos animais foram devidamente executados durante os experimentos. Para os embriões de galinha, inicialmente, foi realizada dessensibilização com gelo e depois fixação em paraformaldeído à 4%. Os camundongos foram anestesiados e sacrificados com saturação atmosférica de gás carbônico. Os embriões de peixes foram deixados em placa de poliestireno com solução anestésica de tricaina (0,66 mg/mL), por 30 minutos, e congelados em nitrogênio líquido. Todos os ensaios, *in vivo*, realizados no Brasil seguiram os procedimentos definidos nos protocolos laboratoriais aprovados sob o número 2012-1331, da Comissão de Ética no uso de Animais da UFSC (CEUA) – Florianópolis, SC; Processo nº PP00826 (Anexo 1).

4.3 ESPÉCIE VEGETAL

A classificação taxonômica da planta *Cissus verticillata* se constitui da seguinte forma: Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes); Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor); Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas); Subclasse: Rosidae; Ordem: Rhamnales; Família: Vitaceae e Espécie: *Cissus verticillata* (LOMBARDI, 1995; 2007).

Uma permissão de Acesso e Remessa de Componente do Patrimônio Genético emitida pelo IBAMA, para utilização de espécies do território brasileiro para estudos científicos é necessária. Para tanto, uma exsicata foi depositada na UFSC, e uma no órgão competente indicado pelo Ibama, neste caso, o Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A permissão para estudo da espécie foi concedida e aprovada pelo Processo/Ibama nº 02001.001806/2013-63 (Anexo 2).

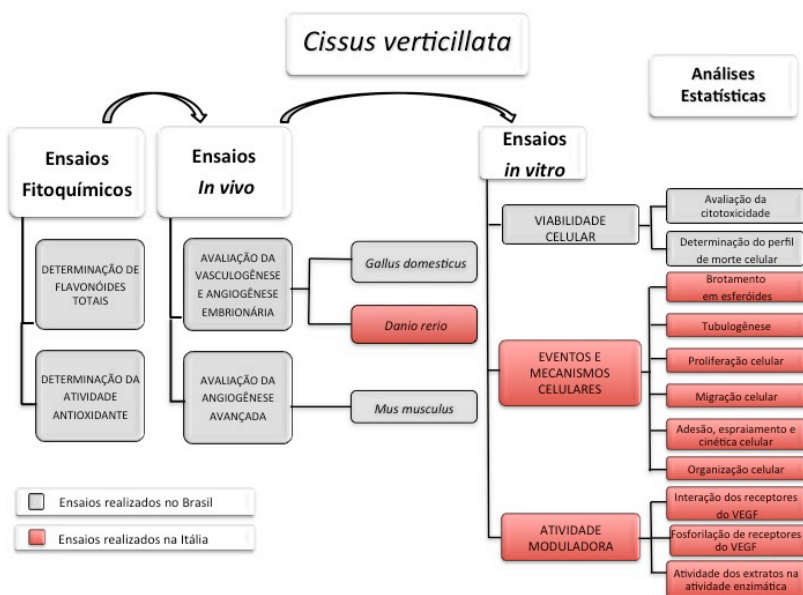
4.4 REAGENTES

1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH, Sigma, St. Louis, MO), brometo de 3 - (4, 5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2, 5, - difeniltetrazólio (MTT, Invitrogen), dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec), salina tamponada fosfatada (PBS, Gibco), indometacina (Sigma, St. Louis, MO), colágeno I (COL I - Gibco TM, Invitrogen), Fibronectina (FN - Gibco TM, Invitrogen), Fibrinogênio (FIB - Gibco TM, Invitrogen) e Fibrina (FB Gibco TM, Invitrogen), placas de cultura (BD Falcon), fibrinogênio (Sigma, St. Louis, MO), aprotenina (Sigma, St. Louis, MO) e trombina (Sigma, St. Louis, MO), anticorpo primário β -tubulina e α -actina (Sigma, St. Louis, MO), anticorpos secundários anti-mouse IgG conjugado- FITC e anti-rabbit IgM (Sigma, St. Louis, MO), 4',6-diamidino-2-fenilindrol dicloridrato (DAPI, Invitrogen), Dako® (IBIDI), Kit de Anexina V conjugado a FITC e Iodeto de Propídeo (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA), Cultrex® (TREVIGEN), meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640 (Gibco), leite em pó (Nestlé), metilcelulose (Sigma, St. Louis, MO), fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-A recombinante humano, Chemicon), D-manitol (Sigma, St. Louis, MO), inibidor 1-fenil 2-tiourea (PTU, Sigma, St. Louis, MO), SU5416 (Sigma, St. Louis, MO), tricafina (Sigma, St. Louis, MO), paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO), Azul de metileno (Gibco TM, Invitrogen), probes de RNA conjugadas a Digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), oligonucleotídeos de morfolino antisense (MO) (Gene Tools, Corvallis, OR), hemostático absorvível Gelfoam® (Millipore), reagente de Drabkin (Kit de dosagem de hemoglobina-Labtest).

5 METODOLOGIA

Para subsidiar os objetivos propostos e a hipótese apresentada no trabalho, estabeleceu-se um fluxograma para visualização dos ensaios realizados (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma dos ensaios realizados com *C. verticillata* L.



Ensaios fitoquímicos, *in vivo* e *in vitro* realizados com os extratos de *C. verticillata*.

5.1 COLETA DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina; em local situado na Avenida Prof. Henrique da Silva Fontes, anexo ao Campus da Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil (27.59932°S; 48.515995°W). O material vegetal foi coletado no período matutino (compreendido das

8:00 às 11:00h) e no segundo mês de cada estação do ano de 2012. As quatro estações deste ano foram contempladas e a coleta das folhas abrangeu folhas de diferentes idades, com aparência saudável e sem cicatrizes.

A identificação da planta (ramo, folha, inflorescência, fruto e semente) foi realizada pelo Professor Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, do Departamento de Botânica (BOT), Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); bem como pela Curadora do Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Dra. Rafaela Campostrini Forzza; e as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Flor do Departamento de Botânica da UFSC, sob a identificação “FLOR 41471”, e no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ, sob identificação RB 563.065 (Anexo 3).

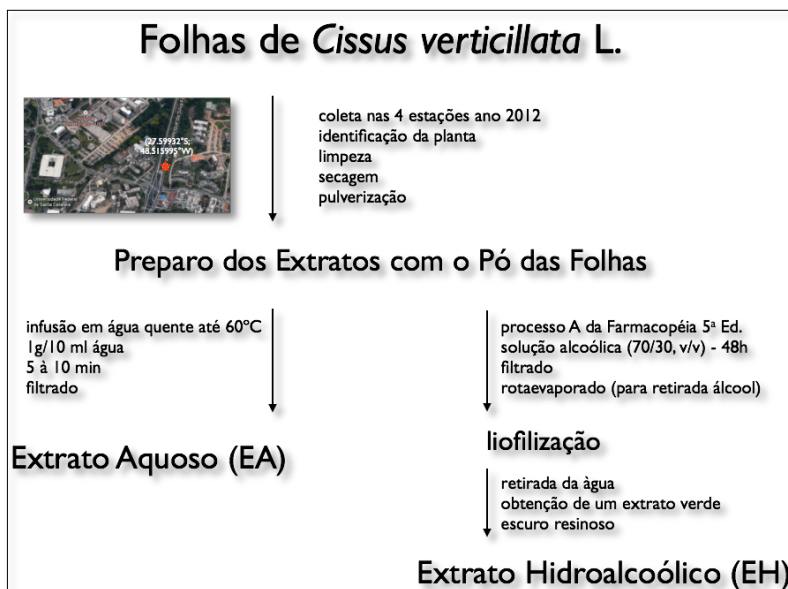
5.2 PREPARAÇÃO DA BIOMASSA E DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *C. verticillata*

A etapa de preparação da biomassa dos extratos das folhas de *C. verticillata* foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal - LMBV (Núcleo de Produtos Naturais) do Centro de Ciências Agrárias – CCA – UFSC. Após a coleta as folhas foram lavadas, uma a uma, secas com papel absorvente e dessecadas em estufa de ar seco circulante, à temperatura máxima de 45°C, até peso constante. Em seguida, foram moídas, em micro moinho Tipo Willye (Tecnal) até granulação mínima. De posse do material moído, passou-se ao protocolo de obtenção do extrato aquoso de *C. verticillata* (*EACv*) e do extrato hidroalcolico de *C. verticillata* (*EHCv*). Para obtenção de ambos extratos seguiu-se as recomendações preconizadas pela Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil 5ª Ed.

O *EACv* foi obtido a do partir processo de infusão (chá) das folhas moídas de *C. verticillata*. A água destilada foi aquecida em placa quente a temperatura controlada até atingir 60°C; em seguida foi adicionado (1,0g/10 mL água) e deixado em repouso por 5 a 10 minutos, sob abafamento. A solução resultante, solução estoque ou matriz, foi filtrada após resfriamento e armazenada em recipiente hermeticamente fechado. O remanescente do material pulverizado foi armazenado em

freezer - 20°C ou - 80°C, protegido da luz para evitar degradação dos constituintes químicos presentes na planta (Figura 10).

Figura 10 - Desenho esquemático representativo da preparação dos extratos.



Fluxograma ilustrando os dois tipos de procedimentos realizados na preparação dos extratos de *C. verticillata*, o EACv e o EHCv. Todas as 4 estações do ano de 2012 foram contempladas com a mesma metodologia. Fonte próprio autor.

A obtenção do *EHCv* foi realizada utilizando o “Processo A” para Extratos Fluidos, descrito na Farmacopéia. Uma solução hidroalcoólica (70/30, v/v), foi escolhida como agente extrator por permitir o arraste de compostos antioxidantes hidrofílicos. O pó da planta foi deixado em contato com líquido extrator por 48h, e agitado esporadicamente, após o *EHCv* foi filtrado e teve a parte alcoólica do solvente evaporado sob pressão reduzida em um rotaevaporador à temperatura de aproximadamente 60°C. O restante do volume total (aproximadamente 30%), seguiu para a etapa de liofilização (retirada da água), em liofilizador à temperatura reduzida, para obtenção do resíduo de *EHCv*. Obteve-se ao final da extração do *EHCv* um resíduo/cristais de

coloração esverdeada escura, que será nomeado como *EHCv*. O liofilizado foi então armazenado em freezer - 20°C, protegido da luz, até a realização das análises. Para os ensaios realizados utilizando o *EHCv* liofilizado, foi utilizado como veículo água destilada estéril, salina e/ou meio de cultura das próprias células para dissolvê-lo.

5.3 ENSAIOS

Os ensaios *in vivo* foram realizados com ambos extratos, e ensaios *in vitro* mais específicos para elucidação do comportamento celular frente a ação do extrato, foi realizado somente com o *EACv*.

5.3.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

Todos os ensaios fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no CCA da Universidade Federal de Santa Catarina.

a. Determinação do conteúdo de flavonoides totais por espectrofotometria por UV

A determinação do conteúdo de flavonoides de produtos naturais é realizada de forma simples e rápida através da espectrofotometria UV, baseando-se na metodologia que utiliza a formação de compostos estáveis associados ao alumínio, como o cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (WOISKY E SALATINO, 1998). Esta metodologia possibilita ainda a determinação da quantidade de flavonoides sem interferência dos demais compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, desviando a análise espectrofotométrica para maiores comprimentos de onda, com uma intensificação da absorção e evitando a interferência de outras substâncias fenólicas nos tecidos vegetais. A leitura é feita em comprimento de onda de 425 nm e utiliza-

se cloreto de alumínio a 2% em metanol, para formar o complexo flavonóide-alumínio, capaz de absorver em comprimento de onda maior do que na ausência do agente complexante.

A quantificação dos flavonoides foi feita a partir de uma curva padrão de quercetina (0,5 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – $r^2 = 0,99$; $y = 0,009x$), onde o valor das absorbâncias aparecem em porcentagem e o teor de flavonoides foi expresso em μg de quercetina por g de massa seca.

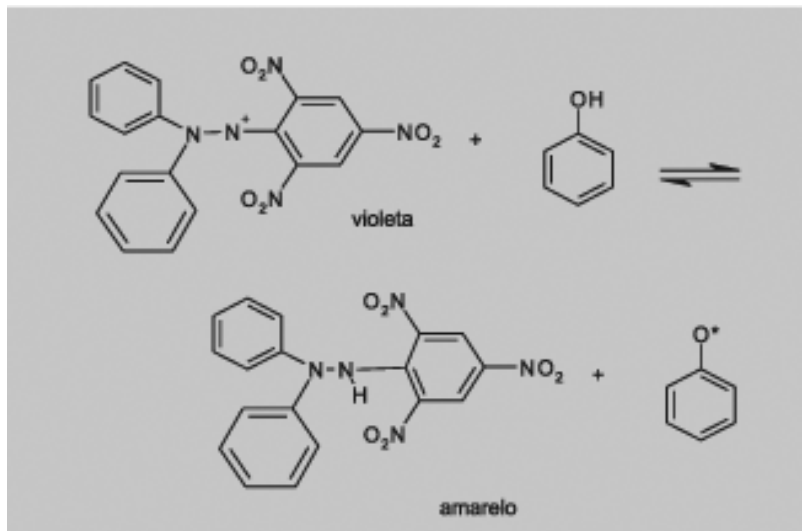
O ensaio foi realizado utilizando uma alíquota de 0,5 mL da amostra vegetal (extratos) (1.000 ppm) adicionados a 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 (a 2 %, em metanol, p/v). Após uma hora de repouso, foram realizadas as leituras das absorbâncias das misturas e como “branco”, foi utilizada uma solução preparada sem a adição da solução de AlCl_3 . Os testes foram realizados em triplicata para cada estação do ano de ambos extratos.

b. Determinação da atividade antioxidante de C. verticillata

A metodologia referida ao 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), utilizada para determinação da atividade antioxidante de vegetais foi descrita por Kim e colaboradores (2002).

Este modelo baseia-se na capacidade do radical livre estável – DPPH (de coloração azul escura) reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ($\text{DPPH} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}$), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY & LISSI, 2005) (Figura 11). O consumo de DPPH permite estimar a capacidade antioxidante através da captura de radicais livres presentes no meio testado pela formação da molécula estável DPPH-H (de cor amarela).

Figura 11. Figura ilustrativa da reação entre anel fenólico (presente em compostos flavonoides) e o radical livre DPPH.



Reação entre o radical DPPH (cor violeta) e anel fenólico indicando a produção de um composto estável (amarelo) através da inibição do radical. Fonte: Chen et al, 2003.

No ensaio espectrofotométrico, a absorvância tende a diminuir como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, conforme o radical vai sendo capturado por antioxidantes presentes no extrato. Portanto, a atividade de sequestro do radical DPPH expressa em porcentagem (%) de inibição, foi calculada conforme equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. final da amostra})}{\text{Abs. controle}} \times 100$$

Uma alíquota de 290 μL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida de 10 μL da amostra (em metanol 80%; extrato equivalente a 10 mg de extrato seco). O decréscimo da absorvância (Abs) em 530 nm foi mensurado em leitora de placas, após 30 minutos de incubação da amostra. BHT isoladamente foi utilizado como padrão e como branco uma solução sem o DPPH. Dados representam a média \pm EPM (n = 3).

5.3.2 ENSAIOS IN VIVO

Modelo de vasculogênese e angiogênese em embriões de *Gallus domesticus* - Ensaios para avaliação dos efeitos dos extratos sobre a vascularização de membranas extraembrionárias.

No Laboratório de Estudos em de Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA), ovos provenientes da indústria avícola (Tayson) foram estocados para estabilização (19 – 20 °C) durante 24 h. Os ovos foram incubados por 48 h, em estufa equipada com ventilação forçada, mantendo-se saturação de umidade e temperatura controlada a 37,5°C (Figura 12A). Uma janela (10 mm de diâmetro) foi aberta na casca os ovos na posição em que se encontra o embrião, e um orifício foi aberto na câmara de ar para a retirada de 3 a 5 mL de albúmen (Figura 12 B).

Os extratos sob estudo (*EACv* e *EHCv*; 1, 5 e 10 mg/ml), foram adsorvidos a discos de metilcelulose (0,75 % p/v; 7,5 µl) polimerizados em ambiente de fluxo laminar, sobre uma forma de teflon[®]. Como controle negativo foi utilizado o solvente de diluição dos extratos (salina) e VEGF-A (50 ng) como controle positivo. 10 µl dos tratamentos (n = 7/tratamento) foram efetuados por implantação dos discos de metilcelulose 1,5% (2 mm Ø, 1 disco/embrião) sobre ilhotas sanguíneas da membrana vasculosa da vesícula vitelínica próximas ao embrião, na idade de 48 horas (idade embrionária E2; estágio 13 Hamburger e Hamilton- HH) (Figura 12 C e D).

a. Ensaio de vasculo-angiogênese na membrana do saco vitelínico de embriões de *G. domesticus* (YSM Assay) e análises morfobiométricas dos embriões.

Com o objetivo de investigar a ação dos extratos de *C. verticillata* na formação de vasos primordiais do embrião em estágio E2-E4, formados por vasculo-angiogênese, foi realizado o ensaio da membrana vitelínica (DIAS et al., 2008). Este método foi uma adaptação do ensaio da membrana corioalantóica (*CAM assay*) descrita na sequência.

Os extratos foram aplicados nos embriões através da implantação de discos de metilcelulose após 48 horas de incubação (E2), próximos do embrião na região das ilhotas sanguíneas (Figura 12 C). As janelas foram fechadas com fita isolante preta e os ovos reincubados até o 4º dia de incubação (E4) (Figura 12 C e D).

Figura 12 – Fotografia da incubadora de ovos e do embrião de *Gallus domesticus* com o disco de metilcelulose adsorvido na membrana extraembrionária e esquema representativo do ovo e rede vascular do embrião.

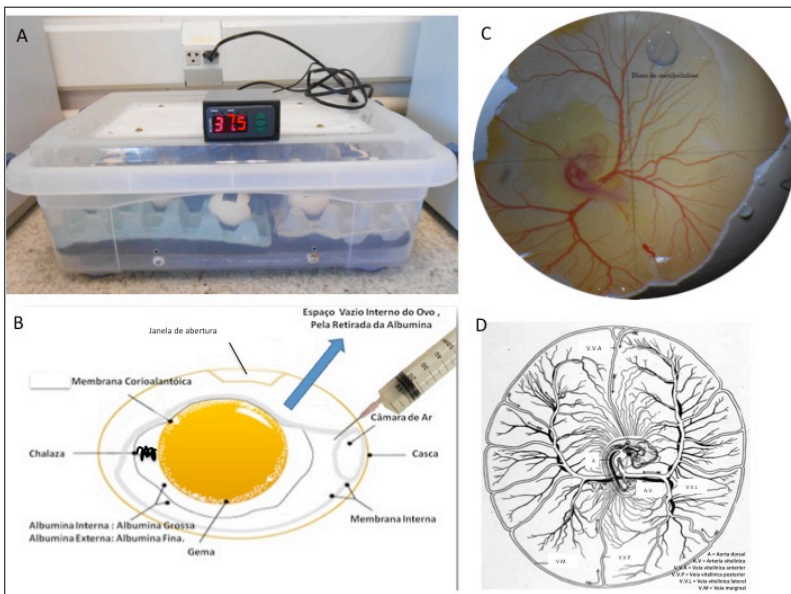


Figura mostrando imagem da (A) incubadora de ovos na temperatura de 37,5°C, ideal para incubação dos ovos; (B) esquema ilustrativo da retirada do albúmen e abertura da janela na parte superior ovo; (C) fotografia do embrião no estágio E4, indicando a localização do disco de metilcelulose (azul) e (D) esquema representativo de um dos arcos circulatórios do embrião, o vitelínico. Fonte: Imagem A e C próprio autor; imagem B modificada da internet (http://m-claudia-carvalho.zip.net/arch2010-08-15_2010-08-21.html) e imagem D modificada da internet (<https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BookTheEarlyEmbryologyoftheChick13#TheVitellineCirculation>).

As concentrações dos extratos adsorvidos nos discos de metilcelulose foram 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, isolados e coadministrados com FGFb, sendo este utilizado como controle positivo no teste. O controle foi realizado com aplicação de salina. É importante destacar que esses valores de concentrações foram calculados a partir do peso médio de um embrião o qual, nesse período de desenvolvimento, é de aproximadamente 0,042 g. O grupo experimental controle para o ensaio foi realizado inserindo apenas o disco de metilcelulose sobre as membranas, para avaliar a possibilidade dos vasos sofrerem influência de outros fatores reguladores (por exemplo, pressão mecânica).

Para análise dos resultados, os vasos sanguíneos no limite do disco de metilcelulose foram quantificados em um microscópio estereoscópico e expressos como porcentagem de vasos em relação ao controle.

Para investigar a possível influência negativa dos extratos sobre a morfogênese, os embriões de *G. Domesticus* em estágio E4, estudados neste ensaio, foram, após eutanásia, transferidos para a placa de petri e submetidos à avaliação biométrica (determinação do comprimento corporal “CR”, i.e, medida padrão – crown rump) no eixo céfalo-caudal. Para a realização das medidas foi utilizado uma lâmina padrão com escala milimétrica para estereomicroscópio. As doses utilizadas dos extratos na realização destas análises foram as de 1 e 10 μg .

b. Ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica de embriões de *G. domesticus* (CAM assay)

Embora os embriões de aves sejam comumente empregados como modelo para estudos nas áreas de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento, eles também têm sido usados como modelo para estudos de fármacos e de embriotoxicidade, além de eficazes biomarcadores na avaliação de segurança de plantas medicinais e fitoterápicos por apresentarem alta sensibilidade à ação de agentes químicos (BRUNSTROM, 1986; 1988; ENGWALL, BRUNSTROM e JAKOBSSON, 1994).

Para a avaliação do processo de angiogênese realizou-se o ensaio *in vivo* da membrana corioalantóica (CAM assay), seguindo-se os mesmos procedimentos previamente descritos para o ensaio anterior de vasculo-angiogênese. A implantação dos discos de metilcelulose é realizada no terço externo da membrana corioalantóica (Figura 12 C),

formada pela fusão do mesoderma somático do córion com o mesoderma esplâncico do alantóide, durante o 4º e 5º dia de desenvolvimento embrionário.

Após os tratamentos, as aberturas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos reincubados por mais 48 horas, completando 8 dias de experimento (E8). A análise do processo de angiogênese na *CAM assay* seguiu os mesmos critérios descritos para *YSM assay*. Para análise dos resultados, os vasos sanguíneos no limite do disco de metilcelulose foram diretamente quantificados em um microscópio estereoscópico e expressos como porcentagem de vasos em relação ao controle. Dados representam a média \pm EPM (n = 3).

c. Ensaio de angiogênese no tecido subcutâneo de adultos da espécie *Mus musculus*.

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da angiogênese em animais adultos, por implante dos discos de hemostático de Gelfoam[®], foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), fêmeas (20 \pm 5 g de peso), com aproximadamente 60 dias, divididos em grupos e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura 25 \pm 2°C ~ 60% umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

O modelo é utilizado para avaliação da angiogênese adulta descrita por Fajardo e colaboradores (1992). Discos de Gelfoam[®], hemostático absorvível, de diâmetro do disco 6 mm x 10 mm de espessura, foram preparados de forma asséptica em fluxo laminar e acondicionados em recipiente estéril. Previamente aos implantes, os animais foram submetidos a uma anestesia intramuscular de 85% de quetamina (4,25mg/kg, Syntec) e 15% de xilazina (0,25 mg/kg, Syntec). Em seguida a região dorsal foi tricotomizada e para assepsia do local foi utilizada a iodopovidona. Uma incisão de aproximadamente 1 cm de comprimento foi realizada na região dorso-lombar da pele dos animais. Os implantes foram inseridos aproximadamente 1 cm abaixo da região dorsal da cabeça e sendo realizada uma sutura com um ponto, para fechamento da lesão. Os animais foram colocados sob luz para

aquecimento no pós-operatório e em seguida em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração.

Figura 13 – Esquema representativo do ensaio de angiogênese no tecido subcutâneo de adultos da espécie *Mus musculus*.

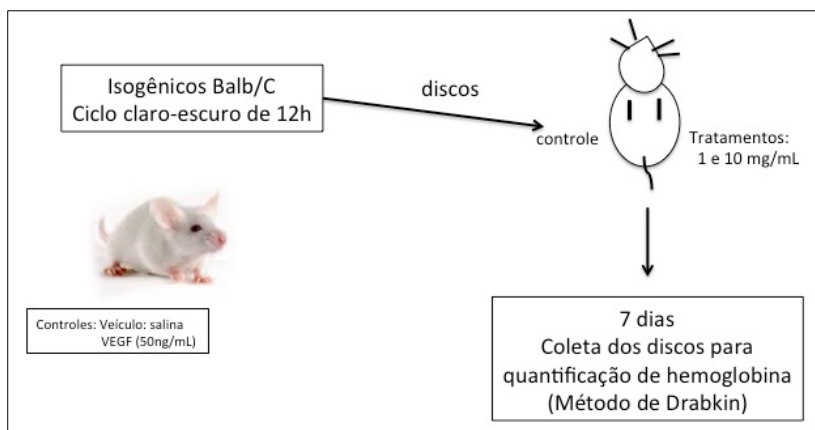


Figura esquemática mostrando o desenho experimental do ensaio de avaliação da angiogênese no dorso de camundongos. Fonte: próprio autor.

A avaliação da angiogênese foi realizada através de método colorimétrico a partir da medição do conteúdo de hemoglobina dos implantes pelo método de Drabkin & Austin (1932), adaptado como índice de neovascularização por Plunkett e colaboradores (1990). As amostras foram analisadas ao final de 7 dias do experimento. No final do experimento os implantes foram removidos e avaliados.

Os implantes foram homogeneizados em 2 mL de reagente de Drabkin, o homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 4000g e o sobrenadante filtrado em filtro 0.22 μm . A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 540 nm, usando leitor de placas pelo método ELISA. A concentração de hemoglobina foi obtida comparando-se as leituras obtidas com uma curva padrão previamente estabelecida e foi expressa em μg de Hb/mg de tecido. Dados representam a média \pm EPM (n=3).

d. Ensaios de vasculogênese e angiogênese na membrana do saco vitelínico de embriões de *Danio rerio* (Zebrafish).

Os ensaios deste modelo foram realizados na *Università degli Studi di Brescia* (Itália), sobre a coorientação do Prof. Dr. Marco Presta. Inicialmente foi planejado um ensaios de toxicidade para avaliar a concentração adequada para a realização dos ensaios.

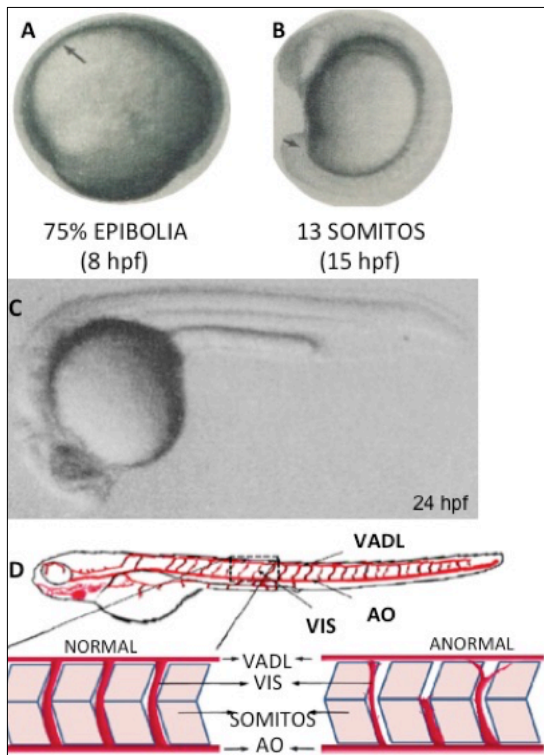
Dois estágios do desenvolvimento foram escolhidos para iniciar o tratamento. A gastrulação tardia (75% epibolia ou 8 horas pós fertilização - hpf) permite verificar os efeitos dos extratos na formação dos vasos sanguíneos primordiais por vasculogênese (aorta e veia cardinal posterior); e o estágio de 13 somitos (15 hpf) permite verificar a angiogênese nos brotamentos dos vasos intersegmentares derivados da aorta (STATON et al., 2004; TOBIA, 2011) que se estendem entre os somitos e formam as veias anastomosadas dorso-laterais (Figura 14).

Objetivando avaliar a vasculogênese e angiogênese na formação dos vasos sanguíneos como na aorta dorsal e nos vasos intersegmentares (intersomíticos), respectivamente, utilizamos embriões de zebrafish *wild type* (WT) e transgênicos KDR-GFP (VEGFR2; marcador de endotélio vascular na formação dos vasos intersegmentares).

Para otimizar os protocolos e permitir que os embriões continuem incolores facilitando a observação da formação dos vasos sanguíneos, a inibição da produção de melanina foi realizada adicionando à água específica para os embriões de peixe 0.003% do inibidor 1-fenil 2-tiourea (PTU; Sigma P-7629) (KARLSSON et al., 2001). É importante salientar que este tratamento não interfere no desenvolvimento vascular (ISOGAI et al., 2001).

Os embriões fertilizados, recolhidos em placas de petri de plástico mantidos em água peixe (vide item 4.2), foram decorionados manualmente com a utilização de pinças cirúrgicas, submetidos ao tratamento com extratos nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, nos estágios mencionados acima e mantidos em estufa a 28,5°C até o estágio de 30 hpf. A solução de 0,01% (v/v) de DMSO foi utilizada como veículo; como controle negativo 1 µM do inibidor de tirosina cinase SU5416 (Sigma) (em 0,01% DMSO) foi utilizado para suprimir a sinalização de VEGF (HERBERT et al., 2009).

Figura 14 – Embriões de *D. rerio* em diferentes estágios do desenvolvimento e esquema representativo do sistema vascular na região trunca do embrião.



Embriões de *D. rerio* em A) 75% epibolia, B) 13 somitos e C) 24 hpf . Em D esquema mostrando a rede vascular do embrião em 24 hpf, evidenciando a região trunca, com desenvolvimento normal e anormal da angiogênese. AO = aorta, VIS = vasos intersegmentares, VADL = vasos anastomosados dorso-laterais. Fonte: Kimmel et al., 1995 (A, B e C) e Bansode et al., 2013.

Para otimizar os protocolos e permitir que os embriões continuem incolores facilitando a observação da formação dos vasos sanguíneos, a inibição da produção de melanina foi realizada adicionando à água peixe 0.003% do inibidor 1-fenil 2-tiourea (PTU; Sigma P-7629) (KARLSSON et al., 2001). É importante salientar que

este tratamento não interfere no desenvolvimento vascular (ISOGAI et al., 2001).

Os embriões fertilizados recolhidos e mantidos em placas de petri de plástico em água peixe foram decorionados manualmente com a utilização de pinças cirúrgicas, submetidos ao tratamento com extratos nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, nos estágios mencionados acima e mantidos em estufa a 28,5°C até o estágio de 30 hpf. A solução de 0,01% (v/v) de DMSO foi utilizada como veículo; como controle negativo 1 µM do inibidor de tirosina cinase SU5416 (Sigma) (em 0,01% DMSO) foi utilizado para suprimir a sinalização de VEGF (HERBERT et al., 2009).

No estágio de 30 hpf, os embriões foram anestesiados com triclaína (Sigma – 0,66 mg/mL) e colocados sob placas de petri recobertas com gel de agarose para melhor acomodar os embriões. As imagens foram coletadas usando estereomicroscópio epifluorescente Leica MZ16 F (1× Plan Apo objetiva; NA, 0.141) equipado com uma câmera digital DFC480 e software ICM50[®] versão 2.8.1 (todos da Leica, Wetzlar, Germany).

1) Hibridização *in situ*

A utilização de embriões sem pigmentação de zebrafish permite a visualização, identificação e localização de ácidos nucleicos no interior das células do embrião sem alterar sua morfologia ou integridade de seus compartimentos através de técnicas como a hibridização *in situ*; nas quais se combina a visualização direta da genética molecular e seu respectivo fenótipo (MOTER & GOBEL, 2000; PLOEG, 2000; AMANN, 2008).

A hibridização *in situ* é uma técnica que permite verificar no indivíduo completo a localização de genes específicos sem a destruição das células e tecidos. Uma reação entre uma sequência alvo desnaturada e uma sonda (sequência de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados) de fita simples de DNA ou RNA complementar se anela formando um híbrido estável pela ação do calor (SWINGER et al., 1996). A marcação indireta da sonda aumenta a sensibilidade da reação ligando-a uma molécula de digoxigenina (MOTER & GOBEL 2000; PLOEG, 2000).

De acordo com Botari et al. (2006), o protocolo apresenta quatro procedimentos básicos, iniciando com a fixação dos embriões, permeabilização, a hibridização e em seguida detecção da marcação através de microscopia

Embriões tratados com os extratos, nos estágios de 75% epibolia e 13 somitos, após 24 hpf foram selecionados e mantidos em “água peixe” (de manutenção) contendo 1% N-feniltiurea (PTU, 0.2 mM), bloqueador fisiológico de pigmentação. Em seguida, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, por 2 horas a temperatura ambiente, lavados em PBS e desidratados em metanol 100%. Sucessivas etapas de reidratação foram realizadas para permitir a permeabilização dos embriões, com proteinase K (10 µg/µl). A reação foi bloqueada com paraformaldeído (PFA) 4%, por 20 minutos e, seguida de lavagens em PBT. Na fase de pré-hibridização os embriões foram incubados em Mix de Hibridização (do inglês, *Hybridization Mix - HM*), preparando as amostras para a hibridização contendo a sonda VEGFR2 (KDR) (1 ng de sonda/1 µl de *HM*). As probes de RNA conjugadas a Digoxigenina utilizadas neste ensaio foram transcritas de uma sequência linear de cDNA (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Após incubação, sucessivas lavagens foram realizadas e o bloqueio da reação foi feito pela adição de “Blocking Buffer”. Após incubação com anticorpo primário anti-digoxigenina (1:10000) (PAFFETT-LUGASSY & ZON; 2005), os embriões foram incubados na “Staining Solution”, no escuro, sob agitação e monitorados regularmente sob observação em microscópio Leica MZ16F. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no protocolo estabelecido por THIESSE e THIESSE (1998). Ao término da coloração, os embriões foram fotografados em microscópio Axioplan 2 equipado com epifluorescência (Carl Zeiss, Gottingen, Germany).

2) Microinjeção de morfolidos de VEGF

Os morfolidos são agentes utilizados para supressão de genes independentes de RNase e sem interações com estruturas celulares ou extracelulares que poderiam resultar em efeitos falso positivo. Apresentam ainda uma alta taxa de afinidade pela fita alvo, em consequência da sua alta complementariedade das sequências de RNA.

Oligonucleotídeos de morfolino antisense (Gene Tools, Corvallis, OR) foram desenhados para complementar as extremidades exon-ínton do gene VE-caderina do zebrafish. O morfolino padrão (Std-MO:5'-3'CCTCTTACCTCAGTTACAATT TATA) foi utilizado como controle. As injeções de morfolino foram realizadas utilizando-se um estereomicroscópio Leica M165C e uma Picobomba Pneumática PV820 (World Precision Instruments). O volume injetado foi ajustado usando um óleo mineral.

Embriões foram divididos em dois grupos distintos: os injetados (não tratados e tratados com 10 µg/mL de EACv) e os não injetados (não tratados e tratados com 10 µg/mL de EACv). Os injetados receberam 9 ng de morfolino de VEGF no saco vitelínico no estágio de no máximo duas células. Embriões foram mantidos em 28°C até atingirem o estágio de 13 somitos para receberem os devidos tratamentos. Embriões foram decorionados e após 28 hpf foram fixados overnight a 4°C com PFA a 4%. Placas de petri foram cobertas com gel de agarose para acomodar os embriões e as imagens foram coletadas usando estereomicroscópio epifluorescente Leica MZ16 F (1× Plan Apo objetiva; NA, 0.141) equipado com uma câmera digital DFC480 e software ICM50[®] versão 2.8.1 (todos da Leica, Wetzlar, Germany).

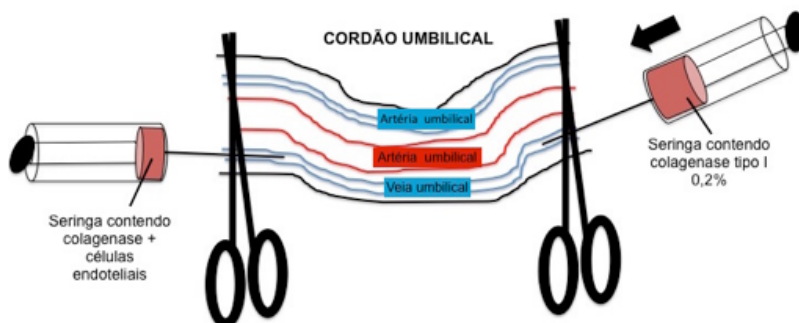
5.3.3 ENSAIOS *IN VITRO*

Devido a vasculogênese e angiogênese não serem definitivamente separadas, tempo-especialmente nos embriões, as células endoteliais humanas alternativamente são uma ferramenta para determinar os efeitos específicos sobre estas células diferenciadas e não suas progenitoras. As vantagens dos ensaios *in vitro* incluem ainda a possibilidade de controlar diferentes parâmetros, como a concentração espaço-temporal de mediadores angiogênicos e ainda permitem elucidar os principais mecanismos e avaliar o comportamento das células envolvidos no processo angiogênico.

a. Isolamento das células endoteliais de cordão umbilical humano

Os cordões umbilicais, coletados no *Ospedale Civile di Brescia*, Itália, foram limpos com papel absorvente e analisados quanto a tamanho e qualidade (sem perfurações). Após limpeza de ambas as extremidades, cada uma recebeu uma cânula na veia umbilical do cordão (Figura 15).

Figura 15. Desenho esquemático representativo do isolamento das células endoteliais de veias de cordão umbilical humano.



Esquema de um segmento de cordão umbilical, indicando os dois tipos de vasos presentes: artéria (vermelho) e veia (azul) umbilical humano. O procedimento necessário para realização do isolamento das células para cultura primária acontece inicialmente com a limpeza da veia com tampão e posteriormente, como indicado na seringa da esquerda, a adição de colagenase tipo I (vermelho) na veia do cordão. Após o tempo de ação da enzima, o conteúdo da solução de colagenase é recolhido, pela seringa da direita e semeada em placas de petri, levadas a incubação. Fonte: próprio autor.

Foi então perfundido 30 mL de PBS estéril, com objetivo de eliminar os resíduos hemáticos presentes no cordão então preenchida com uma solução de colagenase do tipo I (0,2%) e deixado em repouso por uma hora, a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, o cordão foi massageado visando facilitar o destacamento das células endoteliais da veia, e em seguida recolhidas nos 30 mL de PBS perfundido no cordão. As células, depois de recolhidas, foram levadas a incubação para

aderência em condições supracitadas. A manutenção das células endoteliais foi realizada como descrito anteriormente no item 4.1.

b. Avaliação do comportamento das células endoteliais frente a adsorção em diferentes proteínas de matriz

Para os ensaios que envolvem o comportamento de adesão das HUVEC diante da exposição ao(s) extrato(s) em diferentes matrizes foram utilizadas placas de poliestireno não tratados para cultura celular. Desta forma as placas permitiram não somente uma avaliação da cinética de adesão, mas também uma análise do espriamento, morfologia e as diferenças pertinentes na adesão aos diversos substratos avaliados.

Para o recobrimento com as matrizes, no dia anterior ao início do ensaio, as placas foram incubadas *overnight* com PBS contendo 20 µg/ml das diferentes proteínas de matriz a ser testadas, colágeno I (COL I – 5µg/µL), Fibronectina (FN - 5µg/µL), Fibrinogênio (FIB - 1µg/µL) e Fibrina (FB 3,3µg/µL). Após incubação a solução foi substituída por um *overcoating* de albumina bovina (BSA) (1 mg/mL em PBS), cuja função reside na saturação de quaisquer locais de adsorção não específica, por uma hora a 37°C, antes de iniciar o teste de adesão.

c. Ensaio de adesão celular

A adesão celular é uma etapa crítica no processo angiogênico por permitir que as células endoteliais estimuladas por fatores angiogênicos, iniciem o processo de brotamento e a continuidade das demais etapas. O ensaio quantifica o número de células aderidas e coradas pela leitura da absorbância das placas a 595 nm pelo leitor de placas Titertek Multiscan[®], sendo descontadas de todas as amostras o valor do branco. Uma vez que as placas utilizadas neste ensaio não apresentavam tratamentos para cultura, a primeira coluna recebeu somente o *overcoating* de BSA, impedindo desta forma a adesão das células, servindo como branco do ensaio. Os valores adquiridos foram transformados em porcentagens de células aderidas em função do tempo de tratamento.

As células na densidade de 250.000 células/mL foram ressuspensas em meio M199 suplementado com 0,4% de SBF, e aproximadamente 50.000 células com diferentes tratamentos (com extratos de *C. verticillata*) foram semeadas em cada poço (0,7 cm de diâmetro) da placa, previamente adsorvidos com as diferentes matrizes. Após, foram incubadas no intervalo de tempo variando de 5 minutos à 2 horas a 37 °C. Ao final do tempo total de incubação, as células aderentes foram fixadas em PFA a 4% e coradas com 100 µL de uma solução de Azure II - azul de metileno (1:1, v/v). Lavagens sucessivas foram realizadas até que a água estivesse límpida. Os cristais do corante foram solubilizados pela adição de ácido acético a 10% (100 µL/poço) e então realizada a leitura da absorbância. Os resultados foram expressos em percentagem de células aderidas e percentagem células arredondadas (pouco aderidas) em função do tempo de exposição aos extratos. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados representam a média ± EPM (n = 3).

d. Avaliação da atividade citotóxica/ viabilidade

A determinação da atividade citotóxica dos extratos foi realizada através de ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT). O ensaio mede a capacidade de metabolização do MTT (coloração amarelada) pelas enzimas desidrogenases que reduzem os cristais insolúveis de formazan (coloração púrpura) ao final da reação (MOSMANN, 1983).

As HUVEC foram semeadas na densidade de 1000 células/poço, em meio RPMI 1640 com 4% de SBF, em placas de cultura de 96 cavidades. As células em subconfluência foram tratadas com concentrações crescentes de *EACv* ou *EHCv* (0,1 a 1000 µg/mL), por 24 e 48 horas, e o grupo controle utilizou apenas meio de cultura suplementado. Ao termino do tempo, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS, para receber 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) dissolvidos em meio de cultura por 2,5 horas. O MTT foi removido e acrescentou-se 200 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan. As placas foram submetidas à leitura óptica (562 nm) em leitor de placas (TP – READER[®], Thermo Plate), para se avaliar a relação linear entre as concentrações e o número médio de células viáveis por poço (adaptado de Dias et al., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados representam a média ± EPM (n = 3).

e. Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado para avaliar a capacidade de proliferação celular após tratamento com os extratos de *C. verticillata*. Os dados foram avaliados através de um software específico para plotagem dos dados do citômetro de fluxo FACScan[®] (BD Biosciences).

Uma suspensão de HUVEC (20.000 células/poços) foi semeada em M199 completo, em placas de poliestireno de 48 cavidades, com coating de gelatina. Após 6 horas o meio foi substituído pelo M199 suprimido, contendo 2,5% de SBF, *overnight*. Na manhã seguinte foi adicionado 300 µL de M199 com os estímulos a serem testados. Depois de 48h cada poço foi lavado com PBS e recebeu 75 µL de tripsina/cavidade além de 225 µL de PBS 5% SBF. Do volume total 250 µL foi transferido para uma placa de poliestireno de 96 cavidades para a leitura.

Cada ponto experimental foi realizado em triplicata. Os pontos experimentais para os *EACV* e *EHCV* foram utilizados nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, isoladamente ou em coadministração com 50 ng/mL de VEGF-A. Como controle positivo foi utilizado VEGF-A e negativo somente o meio com baixa suplementação, chamado de “*starving*”. Os resultados foram expressos em número de células proliferadas x 10³. Dados representam a média ± EPM (n 3).

f. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

Para determinar o efeito dos extratos sobre a apoptose, outro importante processo envolvido na angiogênese, foi realizado o tratamento com os diferentes concentrações dos extratos no período de 24h. A Anexina V conjugada ao tiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) e iodeto de Propídeo (IP) foram utilizados para analisar quantitativamente a percentagem de células viáveis, apoptóticas ou necróticas em função do tempo de cultura.

Anexina V-FITC é capaz de reconhecer sítios de externalização dos fosfolípidos internos da membrana celular: a fosfatidilserina, característicos de apoptose inicial (KOOPMAN et al., 1994), e o

marcador nuclear IP é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável, sendo portanto, um marcador de necrose.

O kit de Anexina V conjugado a FITC foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. As células foram semeadas em uma densidade de 50.000 células/mL e cultivadas até confluência. Após, os *EACv* e *EHCv* em concentrações crescentes (1, 10 e 100 µg/mL) foram adicionados. O VEGF-A (50 ng/mL) foi usado como controle positivo de viabilidade e como controle negativo utilizou-se o inibidor U0126 (5 µM, inibidor farmacológico de ERK1 e ERK2, envolvidos na via de sinalização do VEGF-VEGFR-2). O VEGF-A e o U0126 foram também utilizados como co-tratamentos com os extratos testados. Após tratamento o sobrenadante e as células foram coletadas e centrifugados. Para a leitura, AV-FITC foi adicionada em cada amostra, em temperatura ambiente e ausência de luz; assim como de IP também foi adicionado às amostras pertinentes no momento das leituras.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II apparatus (Becton Dickinson), alocado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) do Centro de Ciências Biológicas. A análise foi baseada na comparação dos percentuais de células viáveis, apoptóticas e necróticas em cada um dos grupos distintos de tratamento. Os resultados experimentais foram processados utilizando-se o software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR). A análise foi feita a partir do número de eventos adquiridos em cada tratamento sendo comparados os percentuais de células viáveis, apoptóticas e necróticas em cada um dos grupos distintos de tratamento e na presença dos extratos sob estudo e dos respectivos controles positivos. Dados representam a média ± EPM (n = 3).

g. Ensaio de brotamento de células endoteliais em gel tridimensional de fibrina e colágeno (do inglês, *Three-Dimensional Fibrin/Collagen Gel EC Sprouting Assay*)

O método originalmente descrito por Korff e Augustin (1998) permitiu avaliar o comportamento de brotamento de uma esfera de células (HUVEC) em um gel tridimensional mimetizando componentes da matriz extracelular. O protocolo sofreu algumas modificações e

resumidamente, as células foram semeadas na densidade de 800 células/poço, em M199 10% SFB e 2% de metilcelulose. Um volume de 200 μL da solução de células foi semeada em placas de cultura não aderentes de 96 cavidades com fundo côncavo e incubadas *overnight* a 37°C. Estas condições permitem a formação de um único esferóide por poço de tamanho e número de células definido (Figura 16A).

Figura 16: Formação dos esferóides, desenho experimental e fotografia de um esferóide com brotamentos.

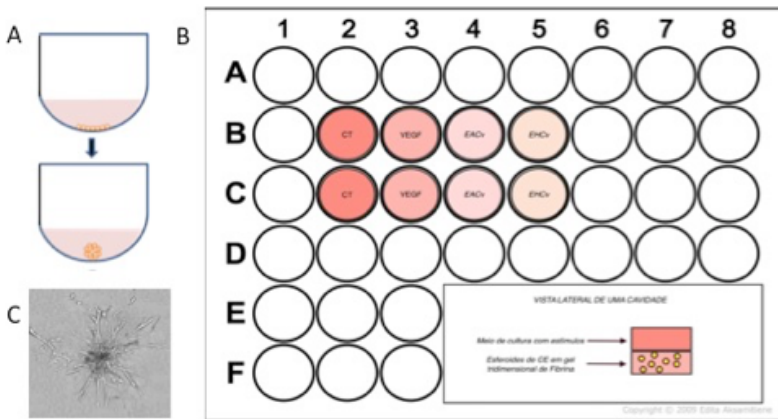


Ilustração do ensaio tridimensional de esferóides de HUVEC. A) Formato dos poços para preparo dos esferóides, B) desenho experimental do ensaio, e visão lateral dos gel contendo esferóides (amarelo) e meio de cultura com tratamentos (parte superior, vermelho); C) fotografia de um esferóide com crescimento celular radial (*sprouting* = brotamento). Fonte: modificada de <http://www.angiogenesis.nl/Techniques%20and%20Models.htm>.

Até este momento a realização do protocolo para ambos os géis de fibrina e colágeno são iguais, portanto, as diferenças na produção da matriz tridimensional são verificadas a partir dos passos seguintes. Para o gel de fibrina, os esferóides foram gentilmente recolhidos (48 poços) e distribuídos em tubos cilíndricos separados por ponto experimental, deixados em repouso para posterior substituição do meio por 800 mL de M199 sem SBF, suplementado com fibrinogênio (2,5 mg/mL), aprotinina (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e trombina (250 mU/mL). Após um minuto

parte desta solução (350 μ L) foi distribuída em dois poços da placa de 48 cavidades e levado a 37°C, por 5 minutos para polimerização do gel.

Após a polimerização os tratamentos foram preparados mediante a adição de 350 μ L de M199 mais *EACv* ou *EHCv* (1, 10 e 100 μ g/mL) isoladamente ou com os estimuladores angiogênicos VEGF-A (30 ng/mL) e FGF (50 ng/mL), controles positivos em cada poço (Figura 16 B). Como controle negativo foi utilizado somente o meio de cultura. Cada ponto experimental compreendeu duas cavidades da placa de 48 poços (cada poço com aproximadamente 30 a 40 esferóides). Após os tratamentos foi observado no período de até 24 horas a formação do crescimento celular radial (*sprouting*). Os resultados foram expressos em número de brotamentos/esferóide. As imagens foram adquiridas em aumento de 40X em microscópio Axiovert 200M (Figura 15 C).

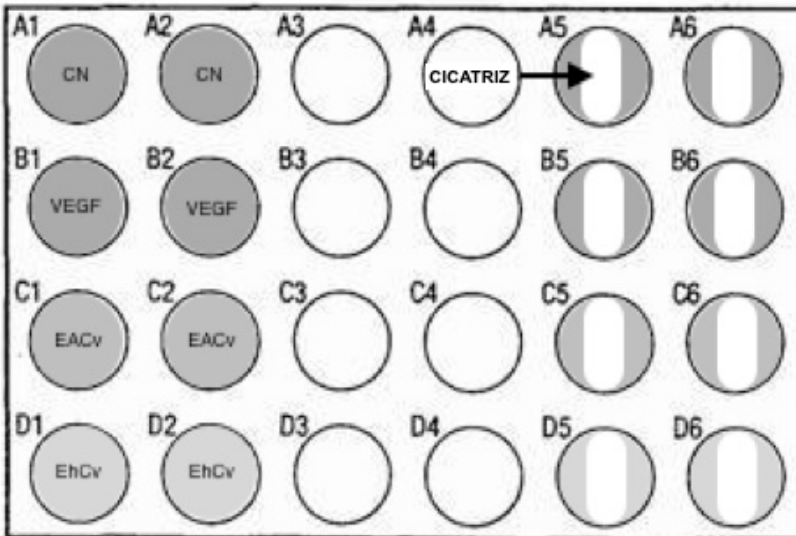
Para o gel de colágeno, após o recolhimento dos esferóides, o meio para cada ponto experimental foi substituído por 220 μ L de M199 2% de metilcelulose e FCS e 180 μ L de M199 10% suplementado com NaOH 0,1 N, Hepes 250 mM e 80 μ L colágeno. Após a distribuição dos esferóides (350 μ L/pç) na placa de 48 poços retornou a incubação a 37°C para polimerização do gel. Os tratamentos foram preparados com adição de 350 μ L de M199 com *EACv* e *EHCv* (1, 10 e 100 μ g/mL) isoladamente ou com os estimuladores angiogênicos VEGF-A (30 ng/mL) e FGFb (50 ng/mL), controles positivos, em cada poço (Figura 16 B). Como controle negativo foi utilizado somente o meio de cultura. Dados representam a média \pm EPM (n = 3).

h. Ensaio de migração celular pelo método da cicatriz (do inglês, Wound-healing assay)

O ensaio *in vitro* de formação de cicatriz (*wound-healing assay*) permite avaliar um evento crucial no processo de brotamento angiogênico - a migração celular (PHILIPS et al., 1991). Seguindo protocolo de Izuta et al (2009), para mensurar a migração unidirecional das HUVEC e suas interações após exposição aos extratos. Desta forma para mensurar a migração celular a partir da borda da cicatriz, foram utilizadas as fotos capturadas em (Tempo = 0) e ao final (Tempo = 1) do experimento, quando o controle positivo apresenta o fechamento total da cicatriz. Com auxílio do programa ImageJ[®] foi calculada a área de fechamento da cicatriz (Figura 17). As fotografias foram adquiridas no tempo 0 (estímulo) e no tempo 1 (final do experimento), utilizando um

microscópio de contraste de fase com uma câmera digital Nikon (Coolpix S3300) de 16.0 Megapixels acoplada na lente objetiva do microscópio invertido (10x).

Figura 17- Desenho experimental do *Wound-healing Assay* no momento inicial do tratamento e ao final do ensaio.



1 ponto experimental = 2 poços
 1 poço = 2 fotografias
 2 fotografias no tempo T = 0
 e 2 fotografias no tempo = 1

tempo T = 0 (início do tratamento)
 e tempo T= 1 (final do experimento)

Desenho esquemático ilustrando o desenho experimental do *Wound-healing Assay*, de como é caracterizada a área aberta da cicatriz sobre a monocamada confluyente de células endoteliais e como foram distribuídos os grupos testados. O meio de cultura “starving” foi utilizado como controle, o meio com VEGF-A foi utilizado como controle positivo e *EACv* e *EhCv* em diferentes concentrações foram testados.

As células foram semeadas na densidade de 1×10^5 a $1,2 \times 10^5$ células/poço, em placas de cultura de 24 cavidades, e mantidas em estufa com o meio M199 completo até subconfluência. A substituição do meio pelo suprimido, contendo somente 3,5 % de SBF (*starved medium*)

foi realizada. Após 6 horas, uma cicatriz linear foi realizada no centro da monocamada celular dos poços com auxílio de uma ponta de micropipeta estéril delimitando o espaço cicatricial. O poço foi lavado com PBS para retirada dos resíduos de células, e em seguida adicionado o meio com estímulos e tratamentos, em meio de cultura *starving*. Cada estímulo foi realizado em duplicata, ou seja, 2 cavidades da placa. Para cada cavidade foram efetuadas duas fotos, sendo 2 no início do tratamento e 2 no final do experimento resultando 8 fotos por ponto experimental (4 após estimulação e 4 ao final do experimentos). Para o grupo controle foi utilizado apenas meio de cultura “*starving*”; como controle positivo foi adicionado ao meio *starving* 50 ng de VEGF-A; foram avaliadas três concentrações crescentes de *EACv* e *EHCv* (1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Dados representam a média \pm EPM ($n = 4$).

i. Ensaio de motilidade celular

Também o ensaio de motilidade de células em uma menor densidade celular foi realizado visando o acompanhamento do comportamento de cada célula individual. As células foram semeadas com os extratos isolados e associados ao VEGF-A e tiveram sua motilidade analisada por meio do *Time Lapse Micrography assay*. Uma suspensão de HUVEC (1.000 células/poço) foi ressuspendas em 300 μL de M199 completo. No dia seguinte, foi substituído pelo meio “*starving*” até o momento do estímulo (tratamentos conforme ensaio anterior). O estímulo foi diretamente adicionado aos poços, evitando qualquer alteração brusca para as células. O meio completo foi utilizado como controle positivo, e meio “*starving*” como controle. O ensaio foi realizado com *EACv* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ na presença e ausência de VEGF-A (50 ng/mL). A placa foi acoplada em microscópio Axiovision® Zeiss, por 5 horas, sendo uma imagem captada cada 5 minutos. Para análise do filme foi calculada a distância acumulada por 30 a 50 células utilizado, no software ImageJ® a opção de ferramenta chamada “*chemotaxis tools*” e os resultados expressos em área de percurso percorrido por célula. Dados representam a média \pm EPM ($n = 10$).

j. Avaliação do Citoesqueleto por imunocitoquímica

O ensaio *in vitro* voltado a análise das fibras do citoesqueleto das células endoteliais expostas a diferentes extratos foi realizado com a finalidade de avaliar a influência dos mesmos nos mecanismos celulares dependentes do citoesqueleto. Imagens fotográficas foram realizadas após 24 horas de tratamento possibilitando uma avaliação morfológica e qualitativa das imagens.

As células foram semeadas na densidade de 40.000 células/poço, em placas de cultura de 48 cavidades previamente acrescidas de lamínula e com coating de gelatina. As células foram mantidas em meio completo até adesão, após foi substituído pelo meio com 5% SFB acrescidos dos estímulos (VEGF-A – 50 ng/mL, *EACv* e *EHCv* – 10 µg/mL e ambos associados ao VEGF-A) por 24 horas. Em seguida foram lavadas com PBS, fixadas com PFA a 4% por 10 minutos e permeabilizadas com PBS Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Novamente lavadas com PBS e reincubadas com solução bloqueadora para sítios inespecíficos (solução de albumina sérica bovina - BSA a 3%, em PBS). Os anticorpos primários para tubulina e α -actina (1:200; falloidina, Life Technology) e tubulina (1:1000; monoclonal, Sigma) foram adicionados e deixados *overnight* a 4°C. Lavagens sucessivas com PBS foram realizadas antes da incubação com anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado - FITC e anti-rabbit IgM (1:200 in PBS/BSA) foram utilizados (Sigma). O núcleo das células foi corado com solução de DAPI (1:50.000). As lâminas foram montadas com Dako® (IBIDI), e as fotos foram realizadas em microscópio Axioplan 2 equipado com epifluorescência (Carl Zeiss, Gottingen, Germany).

k. Ensaio de Tubulogênese (μ -slide angiogenesis®)

O ensaio que permitiu avaliar a capacidade de formação de estruturas tubulares pelas células endoteliais foi realizado utilizando protocolo estabelecido pela empresa IBIDI®, fabricante da placa μ -slide *Angiogenesis* (Figura 18A) associado ao uso do gel para permitir uma condição tridimensional - Cultrex®.

Figura 18 – Placa do ensaio μ -slide® angiogênese (IBID/Cultrex®)

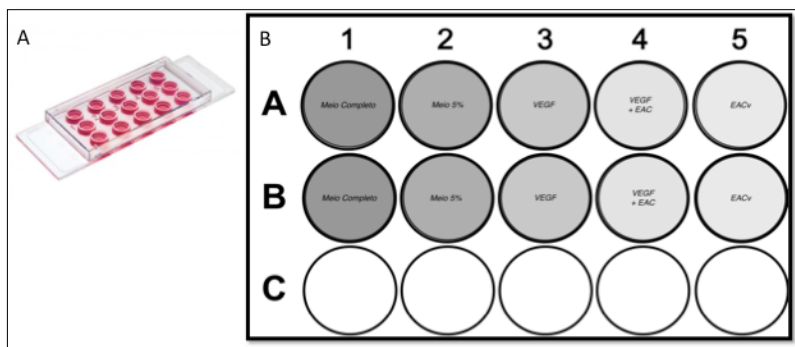


Imagem representativa de uma (A) placa μ -slide® e (B) esquema experimental do protocolo de tubulogênese. Fonte: Imagem A (<http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Slide-Angiogenesis>), e imagem B próprio autor.

Em cada poço da placa foi adicionado 10 μ L de gel Cultrex® que foi deixado de 5 a 10 minutos em incubadora a 37°C para polimerização. As células foram então semeadas sob o gel na densidade de 1500 células/cavidade, em 50 μ L de meio M199 suplementado com 5% SBF e mantidas 24 horas sob incubação a 37° C. O VEGF-A (50 ng) foi utilizado como controle positivo e os extratos (*EACv* e *EHCv*) na concentração de 10 μ g/mL isolados ou associados ao VEGF-A também foram testados (Figura 18 B). A análise foi realizada pela contagem do número de “loopings” ou redes vasculares formados pelas células endoteliais, utilizando um microscópio de luz invertido, em objetiva de 25 X. Os dados foram expressos como o percentual do número de tubos nos grupos tratados em relação ao controle positivo. Dados representam a média \pm EPM (n = 3).

1. Ensaio de Zimografia

Para investigar o efeito do extrato aquoso de *C.verticillata* sobre a atividade enzimática do plasminogênio, enzima envolvida no processo de degradação da matriz extracelular; foi realizado o método de

caseinólise/zimografia (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994). Os resultados foram qualitativamente expressos como intensidade de degradação em relação ao controle.

As células foram semeadas em M199 completo na densidade de 80.000 células/cavidade em placas de poliestireno de 6 poços. Após adesão, os poços contendo as células foram estimuladas em M199 sem SFB e com VEGF-A (50 ng/mL), *EACv* 10 µg/mL, e VEGF-A (50 ng/mL) + *EACv* 10 µg/ml, durante 24 h. Ao término do tratamento, as células foram lavadas com PBS, as células foram lisadas pela adição tampão TRIS/NaCl (60 mM), 0,05% Triton X – 100, pH 8,5. A placa foi mantida sob agitação em câmara fria por 30 minutos. Foi realizado então o doseamento da quantidade de proteínas, baseada na curva padrão de BSA, e o valor correspondente a 50 mg/mL de proteínas foi submetido à eletroforese em gel 10% de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) MINI com 1,5% de gelatina, 0,1% plasminogênio e 20% de leite, usado como substrato para enzima. Após a corrida eletroforética de 4 horas, o gel foi lavado duas vezes em tampão (2,5% de Triton X - 100, 1 mM CaCl₂ e 0,05% de NaCl) por 5 minutos, cada, em temperatura ambiente. O gel foi mantido sob refrigeração e a atividade proteolítica induzida pelo ativador de plasminógeno foi visualizada como bandas transparentes (zonas de degradação da caseína) em contraste ao fundo branco do gel, devido a presença do leite. Os resultados foram expressos qualitativamente pela degradação do substrato pela enzima. O ensaio foi realizado em triplicata.

m. Análise da fosforilação do VEGFR2 (KDR) e PI3K por Western Blot Analysis

Para tentar elucidar uma possível via de ação do *EACv* sobre as células endoteliais, foi verificada a fosforilação de receptores VEGFR2 da superfície celular e também do mensageiro secundário PI3K, como possível alvo interno do extrato utilizando *Western Blot Analysis* para identificar a provável fosforilação destas proteínas após tratamento com extratos. Os resultados foram qualitativamente expressos como intensidade de degradação em relação ao controle.

HUVEC e GM7373 (células endoteliais aórticas de feto bovino – usadas como controle) foram mantidas em meio sem SBF por 24 horas,

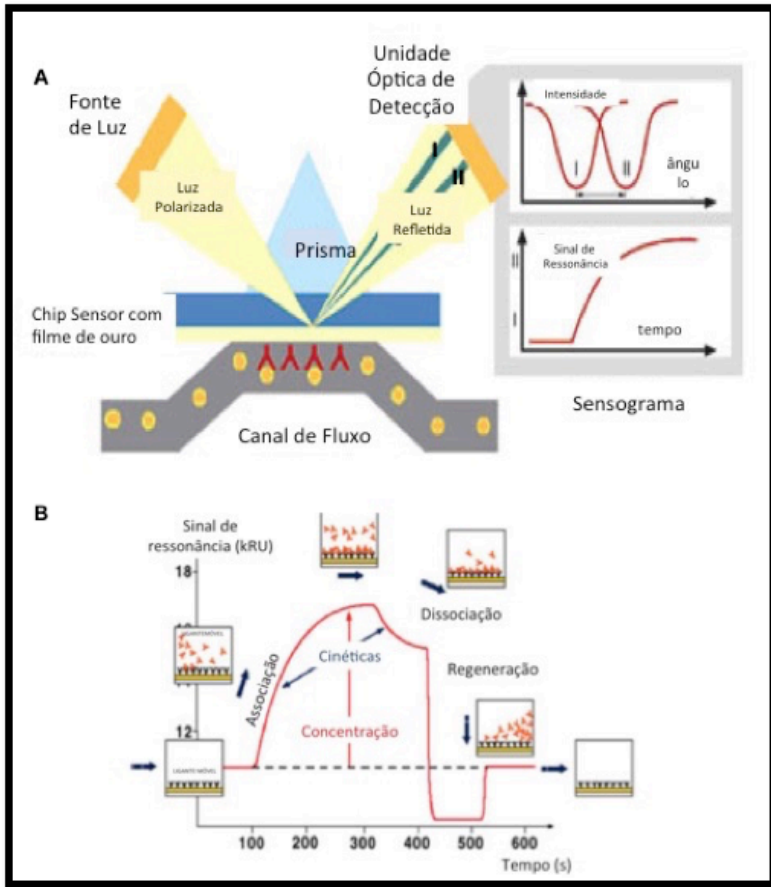
a 37°C. Foram destacadas e ressuspensas em meio com 1% SBF. Aliquotas de 500.000 células foram semeadas até aderência por 30 minutos e 2 horas, para análises de VEGFR2 e PI3K, respectivamente. Então as células sofreram lise em tampão específico, foram centrifugadas (10 minutos, 12000 rpm); um volume de 50 µg de proteína/amostra foi adicionada ao SDS-PAGE MINI, para a corrida eletroforética em gel à 6% (ambos) da proteína anti - P - VEGFR2 ou anti - P - PI3K. A revelação do gel foi feita em câmara escura. Os resultados foram expressos em expressão da fosforilação do receptor VEGFR2 e da PI3K; e o ensaio foi realizado em duplicata.

n. Ensaio em tempo real da interação biomolecular entre receptores VEGF e EACv. (Surface Plasmon Resonance - SPR - binding assay)

A Tecnologia Biacore monitora interações moleculares entre ligantes diferentes, em tempo real, usando uma placa-livre cuja funcionalidade se baseia no fenômeno de ressonância plasmática de superfície (do inglês *Superfície Plasmon Resonance* - SPR).

Uma das moléculas (ligante imóvel) que interagem no sistema é imobilizada sobre a superfície de um chip sensor, enquanto que a outra molécula é injetada (ligante móvel) e flui sobre a superfície do chip sensor (Figura 19A).

Figura 19 – Desenho esquemático representativo do ensaio da interação biomolecular através de Superfície de Ressonância Plasmática - *binding assay* e seu respectivo sensograma.



Esquema adaptado do funcionamento do equipamento Biacore e da interação biomolecular através de um sensograma de Ressonância Plasmática de Superfície indicando as diferentes fases que acontecem, em tempo real, na avaliação da interação entre analitos testados. Eixo x e y equivalem respectivamente ao tempo de corrida do analito móvel pelo sinal de ressonância emitido como resultado da interação entre eles. Fonte: <http://microgen.ouhsc.edu/biacore.htm>

Toda ligação que acontece entre eles resulta em uma mudança no índice de refração e é diretamente proporcional à concentração de biomoléculas sobre a superfície do sensor. A resposta é demonstrada em um gráfico (sensograma) cujos eixos indicam a medida em unidades de ressonância (RU) em função do tempo (Figura 18B). No sensograma é possível distinguir 3 fases distintas: a fase de associação (onde ocorre a ligação até atingir o equilíbrio); fase de dissociação (correspondente ao fim da injeção) e a fase de regeneração (processo de remoção de analito móvel sem prejuízo do ligante imóvel).

A análise da interação dos extratos com os diferentes receptores (fase imóvel) é executada através da injeção da amostra sobre a superfície de modo controlado e contínuo em tampão de corrida. Baseado nisso, foi caracterizado a capacidade do *EACv* (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) inibir a ligação do VEGF-A com os seus receptores, VEGFR2 (KDR) e heparina, imobilizadas sobre um chip sensor. Medições de SPR foram efetuadas num instrumento Biacore T100[®] (GE-Healthcare). Os resultados foram expressos percentagem de ligação ao VEGFR em relação ao controle pela concentração do *EACv* e o ensaio realizado em duplicata.

5.3.4 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra para cada ensaio encontra-se descrito na metodologia pertinente a cada um e/ou nos resultados. A análise do intervalo de confiança da média nos experimentos pilotos (para as dosagens bioquímicas e análises morfométricas) demonstraram que as variáveis que foram estudadas apresentaram baixos valores de erro padrão da média e que com $n = 6$ animais e $n = 10$ campos (para análises das imunocitoquímicas) há confiabilidade nos resultados. Os resultados foram representados pelas médias \pm erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se ANOVA, de uma ou duas vias, dependendo do ensaio, seguida da análise *post hoc* de Newman-Keuls, Tukey ou Bonferrony. Todos os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$ utilizando-se o programa GraphPad Prism[®] 6.0

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E SEU EFEITO ANTIOXIDANTE

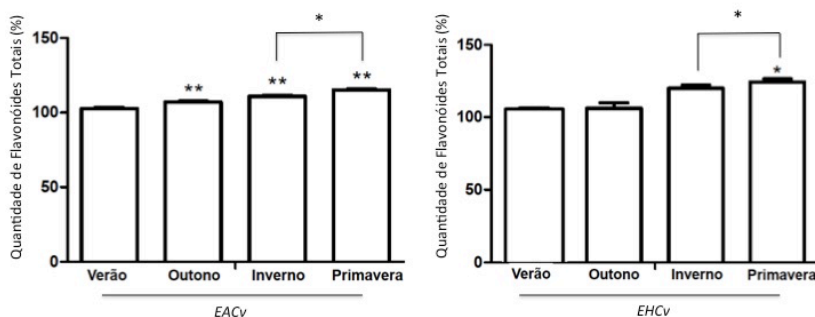
a. Conteúdo de flavonoides totais por espectrofotometria UV

Os experimentos cujos resultados são apresentados a seguir avaliaram o metabolismo secundário da espécie nas diferentes estações do ano a fim de evidenciar prováveis variações na quantidade de flavonoides totais presentes nas amostras.

Os resultados indicam a presença de flavonoides e o gráfico 1 mostra a presença de flavonoides totais dos extratos (resultado em percentagem) em função das estações do ano de 2012, comparativamente a amostra de verão (100%). O gráfico mostra ainda que a primavera, comparada as demais estações do ano de 2012, foi a que apresentou maiores teores destes compostos em ambos extratos.

No gráfico 1A, indicativo do $EACV$, mostrou um aumento significativo no teor de compostos flavonoides nas estações de outono, inverno e primavera. Já no gráfico 1B, referente ao $EHCv$, demonstra um aumento significativo no teor de compostos flavonoides na amostra de primavera, em relação às demais estações. Mesmo sendo a primavera a estação com maior quantidade relativa (130 %) de flavonoides, é possível verificar que na média a quantidade destes compostos é conservada tanto no $EACV$ como no $EHCV$.

Gráfico 1. Conteúdo de flavonoides totais nas amostras dos *EACv* (A) e *EHCv* (B) de *Cissus verticillata*.



Amostra das quatro estações do ano de 2012 foram mensuradas em ambos extratos. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ comparativamente a amostra de verão (ANOVA seguida da análise *post hoc* de Newman-Keuls).

b. Potencial antioxidante dos extratos de *C. verticillata*

Para avaliar a percentagem de inibição do radical DPPH que reflete uma maior ou menor capacidade dos *EACv* e *EHCv* nesta atividade, respectivamente.

Os resultados da Tabela 1 indicam que a inibição do radical DPPH• foi detectado em ambos extratos. Os valores demonstram diferença significativa entre as estações do ano; e que os maiores valores de inibição do radical DPPH•, 52 % e 59 %, foram detectados nos *EHCv*/inverno e primavera de 2012, respectivamente. Os menores valores de inibição observados foram do do *EACv*/verão outono (23 % e 22 %, respectivamente).

Os resultados do teste antioxidante com sequestro de hidrogênio do radical livre DPPH• indicam que nos extratos possivelmente a presença de flavonoides esta relacionada com a propriedade antioxidante dos mesmos.

Tabela 1: Efeito das amostras sazonais dos *EACv* e *EHCv* sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH. (Extrato = 10 mg de Massa Seca).

<i>Estações de 2012</i>	<i>EACv</i> Inibição do DPPH•	<i>EHCv</i> Inibição do DPPH•
Verão	23 ± 1,4*	37 ± 1,4*
Outono	22 ± 0,5*	38 ± 0,5*
Inverno	28 ± 0,9*	52 ± 0,9*
Primavera	29 ± 1,0*	59 ± 1,0*

Médias ± desvio padrão de no mínimo três repetições, diferenças significativas para $p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey. Resultados expressos em $M \pm DP$.

6.2 EFEITOS DOS EXTRATOS NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS (VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE) EM MEMBRANAS EXTRAEMBRIÓNICAS DE EMBRIÕES DE *G. domesticus*

a. Avaliação da vasculo-angiogênese na membrana do saco vitelínico (YSM)

Durante a embriogênese, o plano geral da circulação é estrategicamente estabelecido para viabilizar a organogênese, proteger as estruturas embrionárias e fetais, assim como para prover a súbita mudança no padrão de oxigenação do sangue, que ocorre no nascimento (CARLSON, 2014).

Assim, após a verificação *in vitro* da toxicidade celular pelos extratos, partimos para os ensaios que possibilitassem observar os efeitos dos *EACv* e o *EHCv* nos processos de formação de vasos sanguíneos mais bem estudados, angiogênese e vasculogênese, nos modelos de *YSM* e *CAM assay*, descritos na metodologia.

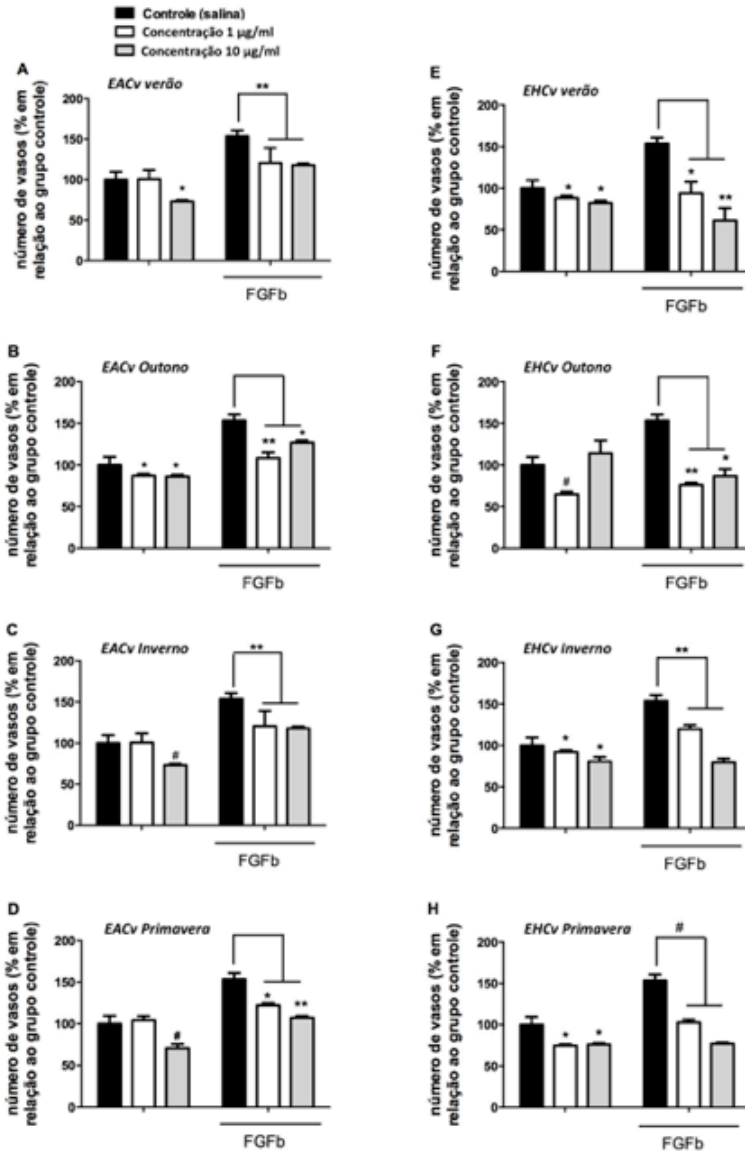
A vasculo-angiogênese inicial foi primeiramente realizada para avaliar o efeito dos *EACv* e *EHCv* isolados, sob as membranas do saco vitelínico, e por conseguinte o ensaio foi repetido associando-se os extratos ao fator angiogênico FGFb objetivando avaliar se os extratos apresentavam uma atividade antiangiogênica através da redução do número de vasos. Dois dias após implantação (realizadas em 48h de incubação - E2) dos discos de metilcelulose adsorvidos com extratos *EACv* e *EHCv*, a vasculatura da membrana vitelínica de embriões de 96h de incubação (E4) foi avaliada.

Os resultados, indicados no Gráfico 2, da avaliação dos extratos demonstrou um desenvolvimento padrão para a idade embrionária E4, apresentando vasos vitelínicos primários, formados independentemente de estímulos exógenos. Uma média de 78 vasos sanguíneos iniciais (equivalente a 100%) foram contados no grupo controle nos limites do disco (com salina).

Os grupos tratados com os *EACv* demonstraram uma redução no número de vasos vitelínicos de 13 a 23% (em relação ao grupo controle negativo - solução salina) e 18 a 31% (em relação ao grupo controle positivo - solução salina + FGF2) de inibição de vasos em torno dos disco comparativamente ao controle. O *EHCv* apresentou uma diminuição no número de vasos vitelínicos de 8 a 26% (grupo controle negativo - solução salina) e 22 a 61 % (em relação ao grupo controle positivo - solução salina + FGF2) de inibição de vasos em torno comparativamente ao controle.

Os processos de vasculogênese e angiogênese inicial (mostrados no Gráfico 2) foram estimuladas pelo FGFb2 adsorvidos nos discos de metilcelulose (154 % de vasos em relação ao controle). Esse aumento de 54% no número de vasos sanguíneos foi parcialmente revertidos pelos *EACv* (31% inibição máxima) e *EHCv* (61% inibição máxima).

Gráfico 2. Efeito dos *EACv* (A-D) e *EHCv* (E-H) sazonais na vasculogênese da membrana vitelínica de embriões de *G. domesticus*.

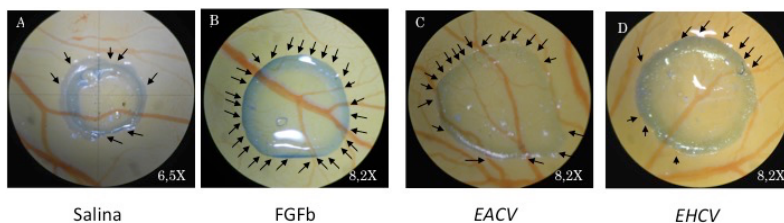


Atividade dos *EACv* e *EHCv* sazonais (1 – 10 ug/mL) na avaliação da vasculogênese de embriões (E4) de *G. domesticus*, após 48h de exposição. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem de vasos sanguíneos em relação ao controle (solução salina). As estações do ano são representadas pelas letras A e E (verão), B e F (outono), C e G (inverno) e D e H (primavera). Nos gráficos as colunas representadas à esquerda demonstram os resultados dos extratos administrados isoladamente, e na direita a ação dos mesmos em co-tratamento com FGFb. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$ e ### $p < 0,0001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise *post hoc* de Tukey).

b. Avaliação da angiogênese na membrana corioalantóica (CAM assay)

Para avaliar o estágio mais avançado, foi realizado o ensaio da CAM, utilizando como controle negativo a implantação de discos de metilcelulose contendo somente solução salina (Gráfico 5). Os resultados indicaram em média um número de 78 vasos sanguíneos (equivalentes a 100%) interceptando o limite do disco (Figura 20).

Figura 20. Fotografias representativas dos discos de metilcelulose implantados na membrana corioalantóica de embriões de *G. domesticus* (E8) na avaliação dos efeitos dos extratos de *C.verticillata* (*EACv* e *EHCv*) sobre a angiogênese (CAM assay).



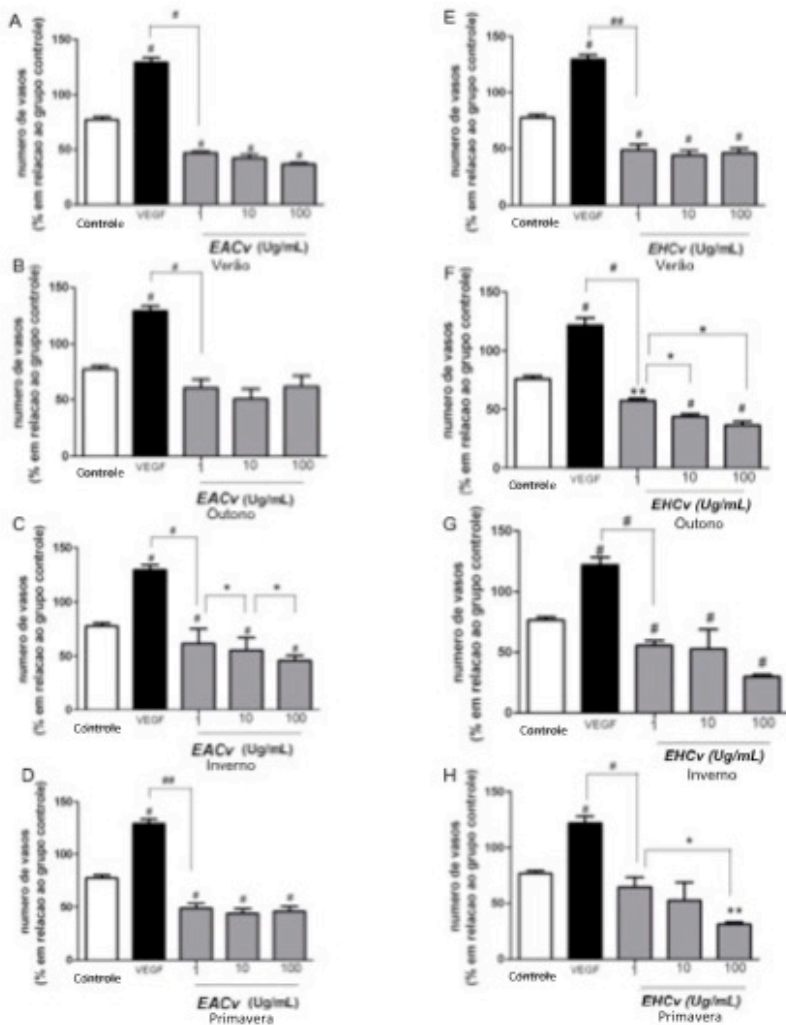
Efeito dos extratos de *EACv* e *EHCv* (10 ug/mL) na avaliação da angiogênese sob ovos de *G. domesticus*, no estágio E8. Disco de metilcelulose com solução salina (A), FGFb (B), *EACv* (C) e *EHCv* (D). As setas em negro destacam a exemplo de vasos contados no limite do disco.

Como controle positivo discos de metilcelulose contendo o VEGF-A, agente pró-angiogênico cujo efeito é bem evidenciado em ensaios angiogênicos, apresentaram em média um número de 122 - 129 vasos sanguíneos (equivalentes a 165 - 156% do controle).

Os resultados relativos ao ensaio da *CAM* não seguiram um padrão de dose dependência em nenhuma das amostras de *EACv* e *EHCv* analisadas. No entanto, nos grupos tratados com o *EACv* (1 - 100 ug/ml) observou-se uma diminuição significativa de 54, 41 e 41% no número de vasos sanguíneos (atividade antiangiogênica) nas amostras de verão, inverno e primavera, respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 3 A, C e D). Os resultados dos tratamentos com *EACv*/outono (1 - 100 ug/ml) não foram estatisticamente significativos (Gráfico 3B).

Nos grupos tratados com o *EHCv* (1 - 100 ug/ml) nas amostras de verão, outono, inverno e primavera, observou-se uma diminuição significativa de 63, 54, 63 e 60% no número de vasos sanguíneos (atividade antiangiogênica) respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 3E - H). Comparando-se os dois extratos é possível perceber um efeito significativo de inibição demonstrado pelo *EHCv*, *in vivo*, comparativamente ao *EACv*.

Gráfico 3. Efeitos dos extratos na angiogênese da membrana corioalantóica de embriões de *G.domesticus*.

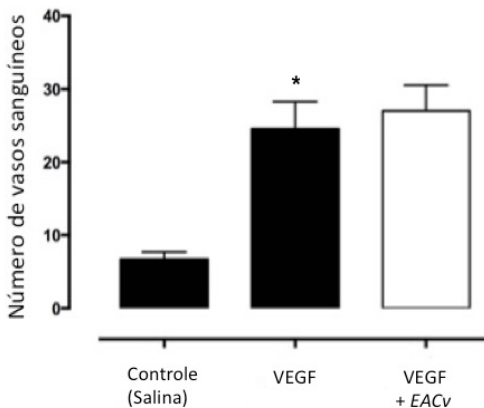


Atividade dos EACv e EHCv sazonais (1 – 100 µg/mL) na avaliação da angiogênese da membrana corioalantóica de embriões (E8) de *G. domesticus*, após 96h de exposição. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos em número de vasos sanguíneos em relação ao controle (solução

salina). Nos gráficos está demonstrado os resultados dos extratos isoladamente e em cada estação. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$ e ## $p < 0,0001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise *post hoc* de Tukey).

A administração concomitante de *EACv* (10 $\mu\text{g/mL}$ pool das amostras das 4 estações do ano de 2012) com o VEGF (50 ng/mL) não mostrou efeito significativo (* $p < 0,05$) sobre a angiogênese na membrana corioalantóica de *G. domesticus* (Gráfico 4).

Gráfico 4. Efeito do *EACv* (10 $\mu\text{g/mL}$) na angiogênese da membrana corioalantóica de embriões de *G. domesticus*.



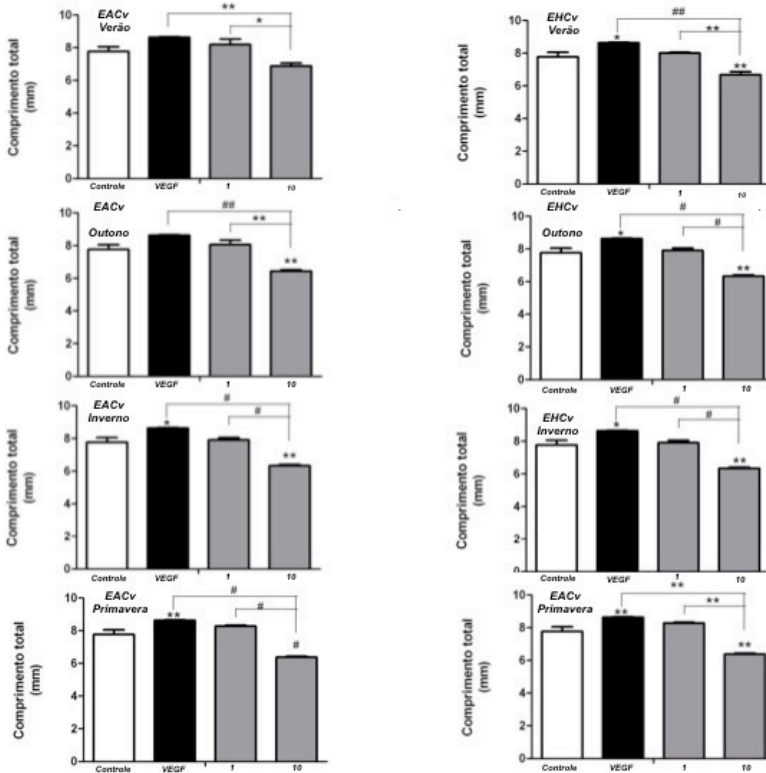
Atividade dos *EACv* sazonais (10 $\mu\text{g/mL}$) na avaliação da angiogênese de embriões (E8) de *G. domesticus*. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem de vasos sanguíneos em relação ao controle. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de * $p < 0,05$; ANOVA seguida da análise *post hoc* de Bonferroni.

c. Morfologia e biometria de embriões (E4) de *G. domesticus* submetidos ao *YSM assay*

Para averiguar a possível toxicidade dos extratos de *C. verticillata* sobre a morfologia externa e o crescimento de embriões de *G. domesticus* (E4), foi realizada a análise morfométrica ao final dos ensaios de vasculo-angiogênese. Os resultados mostrados no Gráfico 5 da biometria (comprimento cefalo caudal) apontam uma redução significativa no comprimento céfalo-caudal dos embriões tratados em relação ao controle, nas condições experimentais descritas para o ensaio (YSM assay).

Embriões cujas membranas vitelínicas foram expostas aos discos de metilcelulose adsorvidos com VEGF (50 mM/mL); grupo controle positivo de vasculo-angiogênese) apresentaram um aumento de até 0,8% no comprimento CR, em relação ao grupo controle (membranas vitelínicas com implantes de disco de metilcelulose contendo apenas solução salina –veículo).

Gráfico 5. Biometria dos embriões (em E4) submetidos ao ensaio de vasculogênese na membrana do saco vitelínico (*YSM assay*).



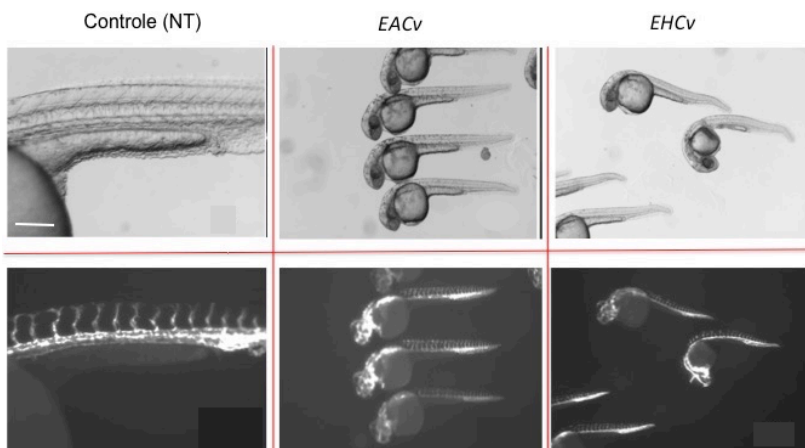
Atividade dos EACv e EHCv sazonais (1 – 10 $\mu\text{g/mL}$) sobre o comprimento total dos embriões (E4) de *G. domesticus*, na presença ou ausência dos extratos ou do VEGF-A (50 ng/mL). Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos em porcentagem em relação ao controle (solução salina). As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $\#p < 0,001$ e $\#\#\#p < 0,0001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA de uma via seguida da análise *post hoc* de Tukey).

6.3 EFEITOS DOS EXTRATOS NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS (VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE EMBRIÕES DE *D. rerio*.

a. Toxicidade dos extratos de C. verticillata em modelo Zebrafish

A possível toxicidade dos extratos de *C. verticillata* foi avaliada em embriões de zebrafish em dois estágios do desenvolvimento distintos que permitiram a avaliação da vasculogênese, bem como da angiogênese concomitante, durante a fase de 75% de epibolia (Figura 21) e no estágio de 13 somitos (Figura 22), respectivamente. Os resultados mostraram não existir diferenças significativas no desenvolvimento dos animais tratados nas diferentes fases embrionárias.

Figura 21. Embriões de zebrafish (24 hpf) tratados no estágio de 75% de epibolia com *EACv* e *EHCv* (10 µg/mL).

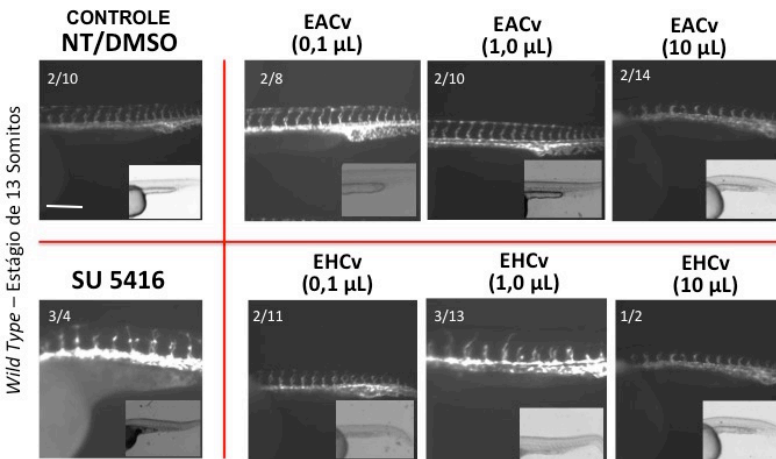


Efeito dos *EACv* e *EHCv* na região trunca e no desenvolvimento de Zebrafish (24 hpf). O grupo controle não tratado (NT) demonstra desenvolvimento normal dos vasos, bem como nos tratamentos. As fotografias superiores indicam microscopia de luz alógena, e as fotografias inferiores, representam o mesmo campo em fluorescência, evidenciando os vasos intersegmentares que sofreram

angiogênese à partir da aorta dorsal, GFP marcados. As fotos foram realizadas em microscópio de fluorescência. Barra = 500 μ m.

A toxicidade dos extratos de *C. verticillata* no estágio de 13 somitos, permite identificar se os vasos intersegmentares desenvolveram regularmente e se existe um padrão de desenvolvimento. Os resultados mostraram existir um retardo no desenvolvimento do embrião como um todo em alguns embriões, de forma não significativa, e também no crescimento dos vasos na fase mais avançada do desenvolvimento (Figura 22).

Figura 22. Embriões de zebrafish (24 hpf) tratados no estágio de 13 somitos com *EACv* e *EHCv*.

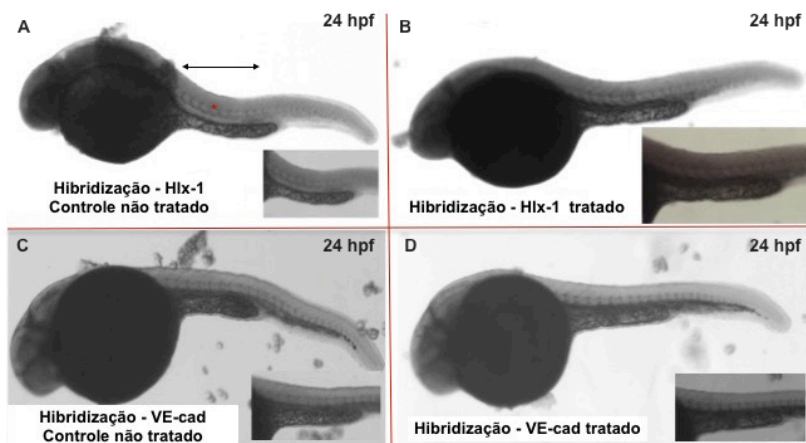


Efeito dos *EACv* e *EHCv*, na região trunca, de zebrafish tratados no estágio de 13 somitos do desenvolvimento. O grupo controle - não tratado (NT/DMSO) demonstra desenvolvimento normal dos vasos (primeira imagem a esquerda). O grupo em tratamento com SU 5416 (foto abaixo do NT) inibidor seletivo do receptor KDR de células endoteliais, que bloqueia a angiogênese e o brotamento. Nos grupos tratados com três doses diferentes de extratos foi possível observar indivíduos com retardo no desenvolvimento dos vasos intersegmentares. Os valores (frações indicados no quadrante superior esquerdo das imagens indicam a representabilidade da amostra (triplicata). As fotos foram realizadas em microscópio de fluorescência em aumento. Barra = 500 μ m.

b. Hibridização *in situ* dos embriões de *D. rerio*

Os resultados (Figura 23) demonstraram que embriões tratados com *EACv* (10 µg/mL), no estágio de 75% de epibolia não mostraram alteração nos padrões de expressão das proteínas de adesão VE-cad e de Hlx-1. A região truncal (indicada pela seta preta, na Figura 23 A) mostra a expressão das proteínas no controle não tratado, durante o brotamento dos vasos intersegmentares (*) do embrião. Embriões tratados no estágio de desenvolvimento de 13 somitos, para avaliar o padrão de expressão durante o início da angiogênese (15 a 18 hpf), também não apresentou diferenças no padrão de expressão destas proteínas.

Figura 23. Embriões de zebrafish marcados por hibridização *in situ* com sondas de RNA de VE-cad e Hlx-1 tratados no estágio de 75% de epibolia com *EACv*.

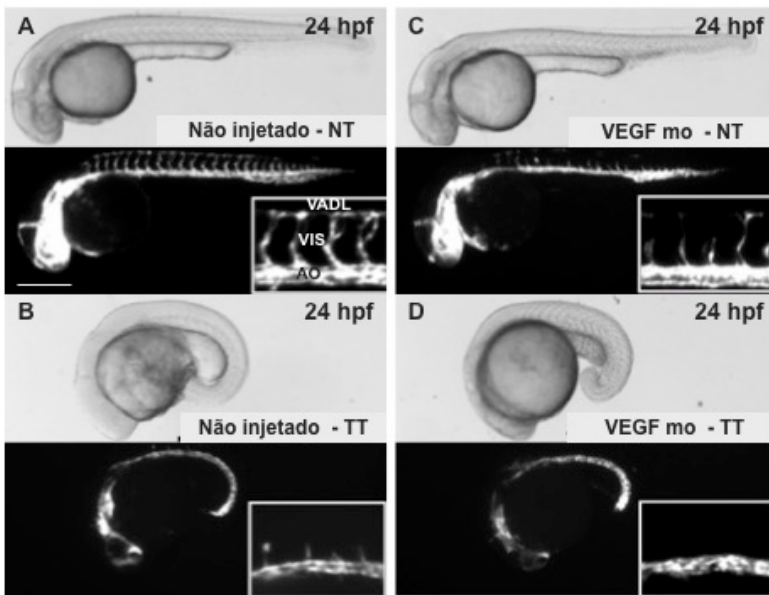


Hibridização *in situ* com sonda de RNA de Hlx-1 (A e B) e VE-cad (C e D). Experimento realizados utilizando animais não tratados como controle (A e C) e animais tratados (B e D) com *EACv*. A região analisada para a expressão de ambas as proteínas é a delimitada pela seta (preta). O * (vermelho) demonstra a região truncal onde estão localizados os somitos e entre eles as veias intersegmentares. As fotos foram realizadas em estereoscópio, aumento de 5x.

c. Análise de morfólino de VEGF

As análises dos embriões de zebrafish que receberam injeções de morfólino de VEGF (9 ng), no estágio de 2 blastômeros, apresentaram um retardo não significativo no desenvolvimento dos vasos comparativamente aos não injetados. Embora um número não significativo tenha apresentado um atraso no desenvolvimento, isto se deve provavelmente a redução do número de vasos sanguíneos observado anteriormente (Figura 22). Entretanto, 48 hpf a vascularização é normalizada nos grupos que apresentaram este retardo, isto é, os vasos intersegmentares (Figura 24 A) brotam da aorta dorsal seguindo entre cada par de somitos, e fusionando com os vasos anastomosados dorso-longitudinais.

Figura 24. Embriões de Zebrafish não injetados e injetados com morfólino de VEGF (VEGFmo) tratados ou não com *EACv* para determinação da expressão gênica de VEGF.



Atividade do *EACv* sobre a expressão de VEGF em embriões de zebrafish injetados com morfolino de VEGF (VEGFmo). Experimento realizados utilizando animais não injetados (A) e injetados (C) como controles da técnica e do experimento. AO = aorta; VIS = vasos intersegmentares; VADL = vasos anastomosados dorso-longitudinais. Ambos grupos tiveram animais não tratados e tratados. As fotos foram realizadas em estereoscópio, com aumento de 5x, barra = 500µm.

6.4 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A ANGIOGÊNESE EM CAMUNDONGOS ADULTOS – ESPÉCIE *M. musculus*.

Angiogênese em adultos se caracteriza, por exemplo, pela formação de vasos sanguíneos no reparo tecidual e em condições do ciclo menstrual. A partir das evidências acima, de que os extratos apresentam atividade antivascularizante e antiangiogênica durante a embriogênese de *G. domesticus* (em E4 e E8), foi analisado o efeito dos *EACv* e *EHCv* sobre a vascularização de camundongos em idade adulta (angiogênese avançada de *M. Musculus*), por meio de implantação subcutânea de plugs discóides de Gelfoam® (gelatina de colágeno) no dorso destes animais.

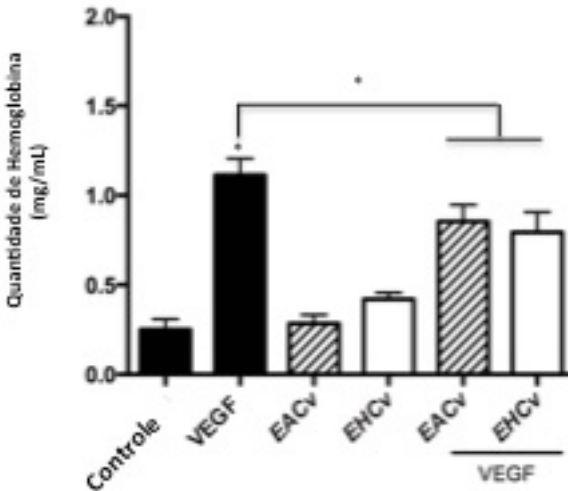
Os vasos sanguíneos presentes no Gelfoam®, formados durante o processo de regeneração da pele em decorrência da cirurgia de implantação do plug, foram relacionados com o teor do sangue, conforme o descrito anteriormente, em materiais e métodos.

Os resultados do Gráfico 6 demonstram que a quantidade de hemoglobina não apresentou diferenças significativas no grupo de animais tratados somente com os extratos (10µg/mL); em relação ao controle (plugs adsorvidos apenas com solução salina; veículo). Entretanto, quando os extratos foram co-administrados com VEGF-A (50ng/mL), ocorreu uma redução significativa da quantidade de hemoglobina, comparativamente ao controle positivo – VEGF-A, o que mostra que tanto o *EACv* como o *EHCv* foram capazes de reverter o efeito daquele potente fator angiogênico.

A não efetividade dos extratos administrados isoladamente nos camundongos, em contraste como efeito inibitório observado especificamente nos grupos tratados com VEGF-A, em adição às evidências de perturbação do crescimento do embrião (morfo/biometria; Gráfico 5), sugerem uma ação embriotóxica, antivascularizante e também antiangiogênica, todas relacionadas ao período de

embriogênese. Em face dessa nova hipótese, optou-se por avaliar os efeitos dos extratos utilizando-se um terceiro modelo de estudo da vasculogênese e angiogênese embrionária e de embriotoxicidade .

Gráfico 6 . Avaliação da angiogênese em camundongos adultos - espécie *M. Musculus*



Atividade dos EACv e EHCv (10 ug/mL) e VEGF (50ng/mL) na avaliação da angiogênese em animais adultos da espécie *M. musculus*, após 7 dias de exposição. Resultados foram expressos como teor de hemoglobina (30 mg/mL; p/v) de vasos sanguíneos presentes nos plugs de Gelfoam®, implantados sob a pele no dorso dos animais. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de *p < 0,05; **p < 0,01; #p < 0,001 e ##p < 0,0001, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise Bonferroni).

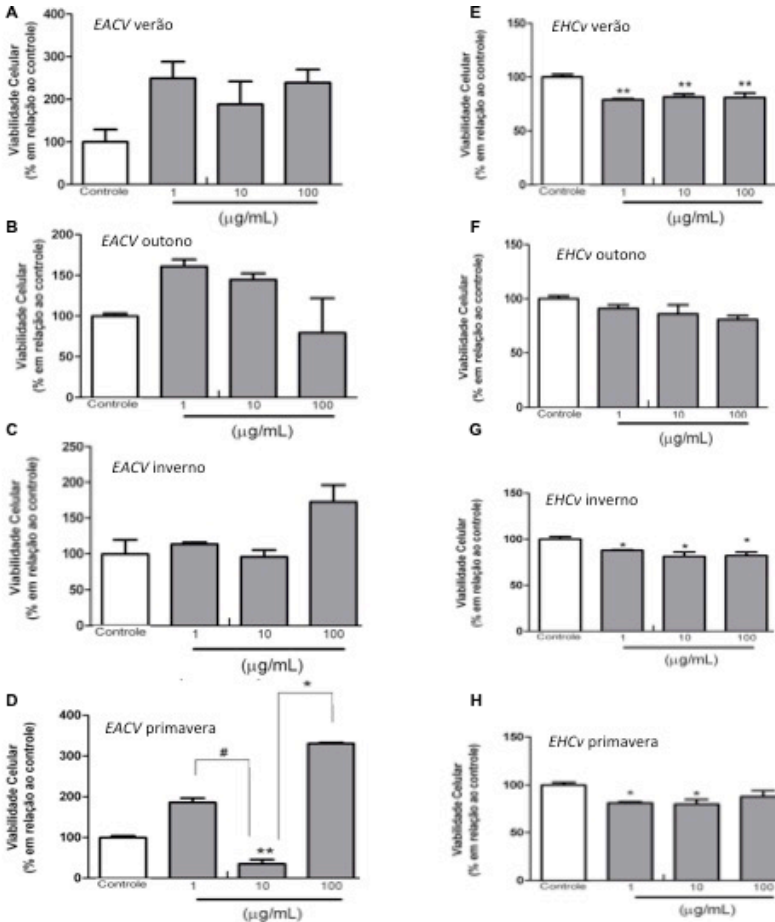
6.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS NA INIBIÇÃO DO PROCESSO DE ANGIOGÊNSE *IN VITRO*.

Após a padronização dos experimentos e verificação das concentrações ideais para os testes *in vitro*, optou-se pela concentração de 10 µg/mL para dar seguimento a investigação.

a. Efeito de amostras sazonais dos extratos de C.vVerticillata na viabilidade celular de HUVEC imortalizadas.

Primeiramente, para iniciar os ensaios *in vivo*, foi examinado o efeito de concentrações crescentes (1 a 100 µg/ml) de amostras sazonais dos *EACv* e *EHCv* [Gráfico 2 verão (A e E), outono (B e F), inverno (C e G) e primavera (D e H) de 2012] sobre a citotoxicidade/viabilidade da linhagem HUVEC através do ensaio utilizando o MTT. O ensaio foi realizado em triplicata nos períodos de 24 e 48 horas.

Gráfico 7. Atividade dos *EACv* e *EHCv* sazonais (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade de células da linhagem HUVEC, após 24h de exposição.



Ensaio de citotoxicidade do MTT. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem do controle (meio RPMI-1640). As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $\#p < 0,001$ e $###p < 0,0001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise *post hoc* de Newman-Keuls). Em alguns gráficos, a escala da ordenada foi modificada em relação aos demais gráficos (padrão) em função do perfil dos próprios resultados.

Como demonstrado no Gráfico 2 e de acordo com os valores descritos Tabela 2, nos grupos de tratamento com o *EACv* (24h), no inverno (C) e na primavera (D) observou-se um aumento (13,3 a 230 % em relação ao controle; 100%) na viabilidade das células endoteliais, nas concentrações de 1 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. As respostas dos grupos tratados com *EACv* (24h) não foram estatisticamente significativas no verão e outono.

Ainda no Gráfico 7 e Tabela 2, é possível verificar nos grupos tratados com os *EHCv* (24h) uma redução de aproximadamente 20% na viabilidade celular nas concentrações de 1 - 100 µg/mL (E e G) e 1 - 10 µg/mL (H) e primavera (H). A resposta ao tratamento com a amostra de *EHCv* (24h) - outono não mostrou-se significativa (Tabela 2).

Os resultados representados no Gráfico 8 e Tabela 2 de grupos tratados com os *EACv* (48h) mostram uma redução (12 a 28 % em relação ao grupo controle) na viabilidade celular nas concentrações de 1 - 100 µg/mL, de forma similar nas quatro estações do ano. Os resultados obtidos com *EHCv* (48h) mostraram uma redução de 25% na viabilidade celular da linhagem celular de HUVEC expostas as concentrações de 1 - 100 µg/mL, nas quatro estações do ano de 2012.

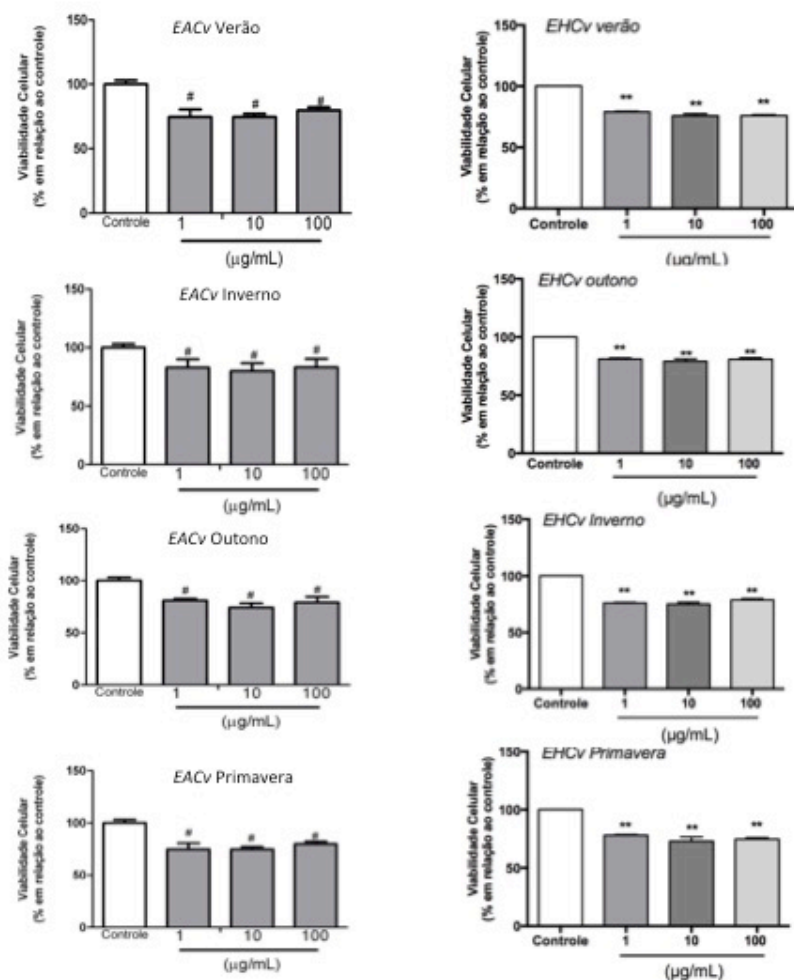
É importante ressaltar que viabilidade das HUVEC imortalizadas tratadas com *EACv* evidenciou uma menor toxicidade para as células endoteliais do que quando tratadas com *EHCv*, tendo inclusive, promovido proliferação celular como pode ser observado nas amostras de inverno e primavera.

Tabela 2. Efeito das amostras sazonais dos *EACv* e *EHCv* (1 – 100 µg/mL) expresso em porcentagem de viabilidade nas HUVEC, nos tempos de incubação de 24 e 48 horas, em relação ao grupo controle 100% de viabilidade).

<i>Extrato</i> <i>2012</i>	<i>EACv</i>	<i>EACv</i>	<i>EHCv</i>	<i>EHCv</i>
	% viabili <i>dade</i> (100; 10; 1) 24h	% viabili <i>dade</i> (100; 10; 1) 48h	% viabili <i>dade</i> (100; 10; 1) 24h	% viabili <i>dade</i> (100; 10; 1) 48h
Verão	239/	82,3 [#] /	81 ^{**} /	80 [*] /
	188/	81,6 [#] /	82 ^{**} /	75 [*] /
	249	78,3 [#]	79 ^{**}	75 [*]
Outono	79/	82 [*] /	81/	83 [*] /
	145/	82 [*] /	86/	80 [*] /
	161	88 [*]	91	83 [*]
Inverno	173/	78 [*] /	82 [*] /	79 [*] /
	96/	72 [*] /	81 [*] /	74 [*] /
	113 [*]	77 [*]	88 [*]	81 [*]
Primavera	330 [#] /	82,6 [*] /	88/	80 [*] /
	35,3/	77 [*] /	80 [*] /	75 [*] /
	184 [#]	85 [*]	81 [*]	75 [*]

Médias de no mínimo três repetições, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS= massa seca.

Gráfico 8. Atividade dos *EACv* e *EHCv* sazonais (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade de células da linhagem HUVEC, após 48h de exposição.



Ensaio de citotoxicidade do MTT. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem do controle (meio RPMI-1640) \pm erro padrão da média. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise post hoc de Newman-Keuls). Em

alguns gráficos, a escala da ordenada foi modificada em relação aos demais gráficos (padrão) em função do perfil dos próprios resultados.

b. Determinação do perfil de morte celular por citometria de fluxo

Para análise do perfil de morte celular as células endoteliais foram analisadas em citômetro de fluxo com 5.000 células ou eventos com marcação celular para apoptose (AV - FITC) e necrose (IP - PE). Em seguida, os gráficos analisados em Flowing Software[®] 2.5.0 para determinação das análises quantitativas demonstradas na Tabela 3, como porcentagem de células, para para o efeito dos extratos sobre os tipos de morte celular.

Os resultados apresentados na Tabela 3, indicam a porcentagem de células marcadas para cada tipo de morte celular, encontradas com o tratamento em diferentes concentrações. O *AECv*, na concentração de 10 µg/mL, mostrou uma tendência à morte celular por necrose quando associada com inibidor de ERK U0126 (controle negativo). Situação similar foi verificada quando as células foram cotratadas com VEGF-A, na concentração de 10 µg/mL. As células com tratamento (10 e 100 µg/mL) apresentaram uma tendência a apoptose. O tratamento estatístico dos resultados não revelou diferenças significativas entre as condições de cultivo. O *EACv* (100 µg/mL) isolado e associado ao VEGF-A demonstrou uma tendência à apoptose. Os resultados sugerem que o *EACv* não influencia na resposta do padrão de morte celular por apoptose ou necrose em HUVEC.

Tabela 3. Efeito do *EACv* de *verão* (10 – 100 $\mu\text{g/mL}$) expresso em porcentagem de eventos nas HUVEC, nos tempos de incubação de 24h.

<i>EACv</i>	<i>Apoptose Positiva</i> (% de Eventos)	<i>Necrose Positiva</i> (% de Eventos)
10 μg + inibidor	0.38	10.72
10 μg +VEGF	26.02	30.84
10 μg	36.32	16.54
100 μg + inibidor	0.22	8.95
100 μg +VEGF	23.19	16.59
100 μg	33.7	18.18

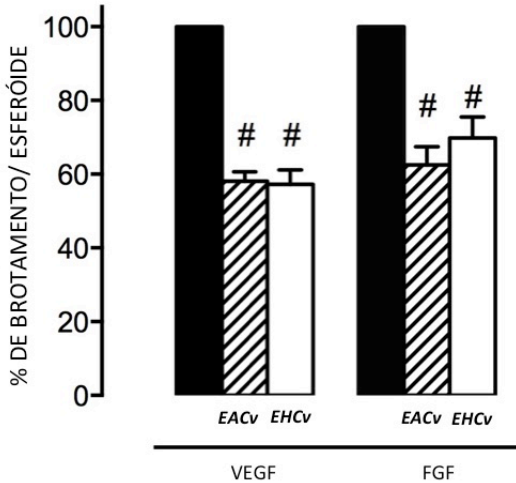
Médias de no mínimo três repetições, os valores não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

c. Avaliação do efeito dos extratos sobre o brotamento de HUVEC

Os resultados demonstraram que o *EACv* reduziu significativamente o número de brotamentos em 42% e 37% frente aos estímulos angiogênicos de VEGF-A (50 ng/mL) e FGFb (50 ng/mL), respectivamente, em 24 horas de tratamento (Gráfico 9).

Já o *EHCv* reduziu significativamente o número de brotamentos em 43% e 30%, respectivamente, frente aos estímulos angiogênicos de VEGF-A (50 ng/mL) e FGFb (50 ng/mL) em 24 horas de tratamento (Gráfico 9).

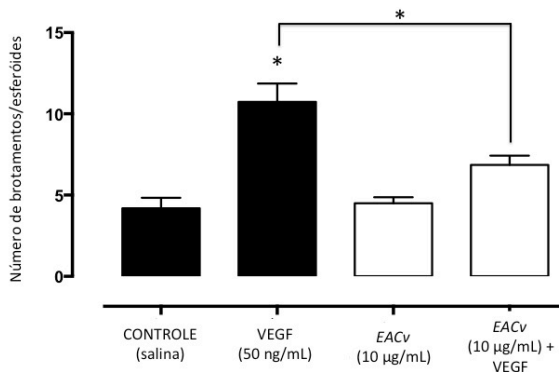
Gráfico 9. Gráfico das análises dos ensaios de brotamento, em gel de fibrina, com VEGF e FGFb.



Atividade inibitória dos *EACv* e *EHCv* (10 $\mu\text{g/mL}$) sobre o brotamento de esferóides estimulados por VEGF-A e FGFb (100%), em gel de fibrina, após 24 horas de exposição. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos em percentagem de *brotamento/esferóide* em relação aos controles VEGF-A/FGFb, respectivamente. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $\#p < 0,001$, (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

Ainda avaliando o número de brotamento, decidiu-se testar o efeito dos extratos sobre o gel de colágeno. Os resultados do gráfico 10 mostram uma redução significativa no grupo experimental exposto ao tratamento do *EACv* co-tratados com VEGF-A, quando comparado ao grupo controle positivo (VEGF-A 50 ng/mL), sendo portanto, capaz de reverter parcialmente a ação angiogênica do VEGF-A. O *EACv* não apresentou alteração significativa da inibição dos brotamentos quando co-administrado ao VEGF-A (dado não mostrado).

Gráfico 10. Gráfico das análises dos ensaios de brotamento, em gel de colágeno, com VEGF-A.



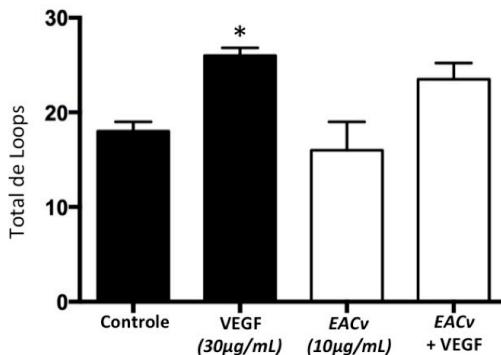
Atividade do *EACv* (10 µg/mL) sobre o brotamento de esferóides em gel de colágeno, após 48h de exposição. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos número de Sprouting/esferóide em relação ao VEGF-A/FGFb. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de * $p < 0,05$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

d. Avaliação do efeito do EACv na etapa de tubulogênese

Na sequência, visando avaliar a ação do *EACv* sobre a capacidade de formação de túbulos - microvasos, por HUVEC, realizou-se o ensaio de tubulogênese sob estímulo concomitante de VEGF-A (Gráfico 11). Neste ensaio foi analisado somente os efeitos da ação do *EACv* foram analisados, uma vez que o *EHCv* se mostrou sem atividade nos ensaios *in vitro* realizados anteriormente.

A análise quantitativa da formação de loops revelou que as HUVEC tratadas com o *EACv* isolado apresenta um nível de atividade basal (média de 16 loops), i.e, similar ao controle (meio de cultura – 18 loops) e ao tratamento com VEGF-A (média de 26 loops). Os resultados mostram ainda que o *EACv* co-administrado ao VEGF-A apresentou uma taxa de 23 loops. O tratamento estatístico revelou não haver diferenças estatísticas entre essas duas condições (VEGF-A e VEGF-A + *EACv*) de cultivo.

Gráfico 11: Gráfico do ensaio de tubulogênese



Atividade do *EACv* na formação de túbulos sanguíneos. Experimentos realizados em triplicata ($n = 3$) e resultados expressos em total de loops formados, comparativamente ao controle. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$; em relação ao grupo controle (ANOVA seguida do teste de *Bonferroni*).

e. Avaliação da proliferação celular de HUVEC sob ação dos extratos

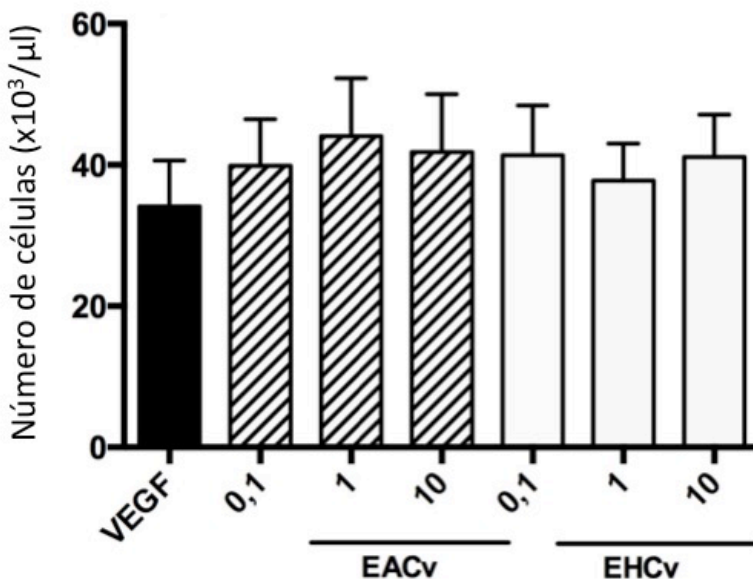
Em vista dos resultados descritos acima, principalmente de inibição da formação de vasos sanguíneos *in vivo*, e da inibição de brotamento de estruturas similares a capilares na presença de VEGF-A e FGFb na linhagem celular HUVEC, passamos a investigar quais os possíveis mecanismos celulares se constituiriam em alvos para os extratos *EACv* e *EHCv*.

Nesse contexto, ainda considerando a importância da proliferação celular durante a elongação das estruturas similares a capilares originados com os processos de brotamento (ensaios de brotamento em gel de fibrina e colágeno-1), avaliou-se a ocorrência de uma possível ação direta dos extratos de *C. verticillata* sobre a proliferação das células endoteliais primárias.

Os resultados obtidos (Gráfico 12) mostram que as HUVEC tratadas com o *EACv* (média máxima de 61, na concentração de 1µg/mL) e *EHCv* (média máxima de 56, na concentração de 0,1µg/mL) não apresentam sua proliferação alterada estatisticamente do grupo controle (salina) (média de 33). Também quando comparados ao

controle positivo (VEGF-A) (média de 47) os extratos não demonstram diferenças significativas na inibição da proliferação.

Gráfico 12. Gráfico representativo do ensaio de proliferação com HUVEC de linhagem primária, sob influência de VEGF-A.



Atividade dos *EACv* e *EHCv* sob a ação do VEGF-A na proliferação celular. Experimentos realizados em duplicata e resultados expressos em número de células (x10³/μl). As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de *p < 0,05; em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida do teste de Bonferroni).

f. Efeito dos extratos sobre a migração celular de HUVEC

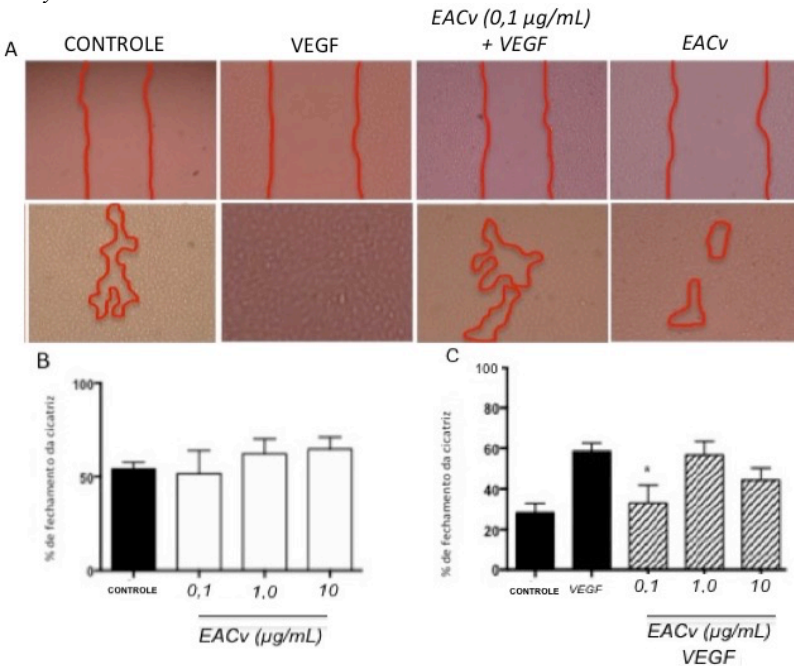
Para avaliar a possibilidade de que um efeito ou ação sobre o citoesqueleto que pudesse bloquear a migração celular foi realizado o ensaio de formação de cicatriz (*wound-healing assay*) em HUVEC (Figura 25 A).

Os resultados (expressos em porcentagem de fechamento da cicatriz) demonstraram que, após 24 horas de exposição, aos extratos

isolados nas concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 25 B) houve uma tendência para a cicatrização, embora Não com diferenças importantes em relação ao controle, nas concentrações testadas. O *EHCv* de forma similar ao *EACv* demonstrou uma tendência, sem diferenças significativas nas diferentes concentrações (gráfico não mostrado).

Contudo, após a associação dos extratos ao VEGF-A; na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do *EACv* (33%) foi observado uma redução de 25% do número de células envolvidas no evento migratório para o fechamento da cicatriz, comparativamente ao controle positivo VEGF-A (58%). O *EHCv* mostrou uma tendência na redução da área da ferida.

Figura 25. Fotografias representativas e gráficos do ensaio de *wound healing assay*



Fotografias das regiões limítrofes da cicatriz delineadas na cor vermelha (A – imagens superiores) e após 24h de tratamento (A - imagens inferiores). Atividade dos *EACv* na migração celular de HUVEC, B) gráfico indicando os testes basal; e C) co-tratamento, demonstrando o efeitos do extrato associado ao

VEGF-A. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem do fechamento da cicatriz. As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise *Bonferroni*). Aumento 20 x, barra = 200 μm .

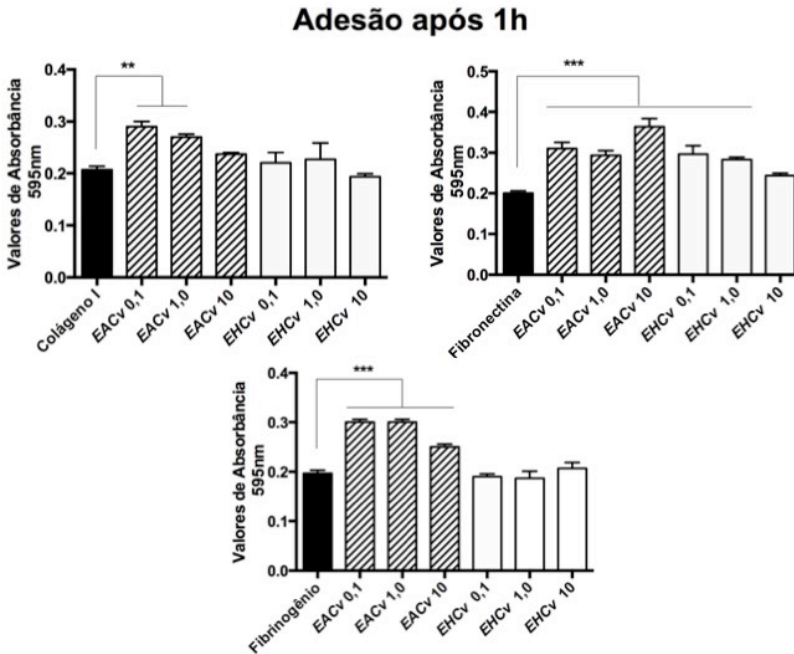
g. Efeito dos extratos sobre a HUVEC no processo de adesão, espraiamento e cinética celular

Para avaliar se os *EACv* e o *EHCv* agem de forma diferenciada em moléculas da matriz, foi utilizado como um controle negativo plástico da placa de cultura sem cobertura, e como matrizes testadas o colágeno I, a fibronectina e a fibrinogênio.

Os resultados (Gráfico 13) expressam a diferença na intensidade de absorbância mensurada (número de células aderidas) em relação aos estímulos propostos.

No colágeno I (gelatina) observa-se um aumento de adesão das HUVEC quando tratadas com *EACv*, nas concentrações mais baixas. Comportamento similar entre as HUVEC tratadas com ambos extratos foi observada na matriz de fibronectina. Exceto a maior concentração de *EHCv* não foi estatisticamente significativa. Na matriz de fibrinogênio, as células tratadas com *EACv*, aumentaram a adesão comparativamente ao grupo controle; enquanto que as células submetidas ao tratamento com *EHCv*, não mostraram alteração de comportamento.

Gráfico 13. Gráfico da adesão celular de HUVEC sob diferentes matrizes.



Atividade dos *EACv* e *EHCv* na cinética e morfologia da adesão de HUVEC em diferentes matrizes celulares. Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos como porcentagem do controle (meio). As barras verticais denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $**p < 0,01$; $***p < 0,001$, em relação a cada grupo controle (ANOVA seguida da análise por Bonferroni).

Para avaliar o comportamento de espalhamento das HUVEC sobre a matriz de colágeno e fibrina, as células foram semeadas e fotografadas nos tempos de 30, 60 e 90 minutos (Figura 26).

As HUVECs sob o plástico permaneceram com aspecto arredondado, não tendo a capacidade de adesão, além de aparentemente perder toda a capacidade de iniciarem o espalhamento.

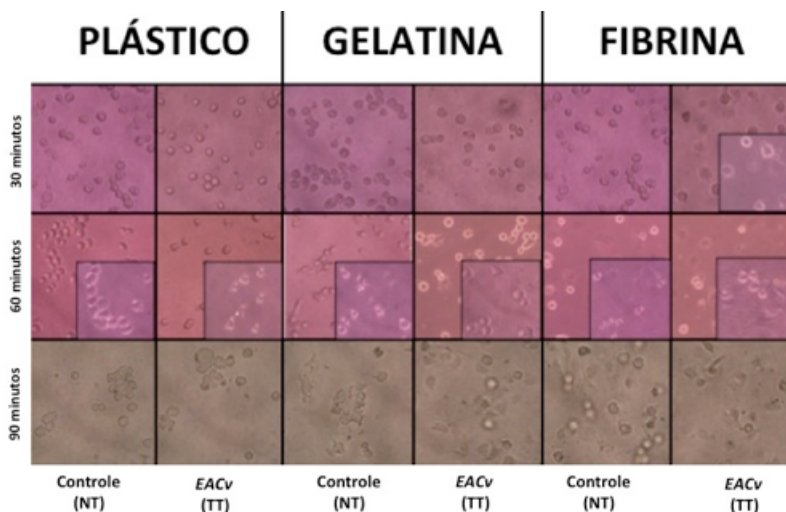
O comportamento celular observado no controle do colágeno I foi diferente do controle da fibrina, com uma menor capacidade de adesão e uma maior dificuldade de espalhamento.

Os grupos tratados com ambos extratos demonstraram um comportamento celular muito similar ao respectivo grupo controle,

indicando um padrão similar de espriamento e de mudanças de morfologia durante o processo de adesão.

Entretanto, os extratos apresentaram uma tendencia a maior adesão nos primeiros 30 minutos de exposição ao tratamento, na matriz de fibrina comparativamente à de colágeno.

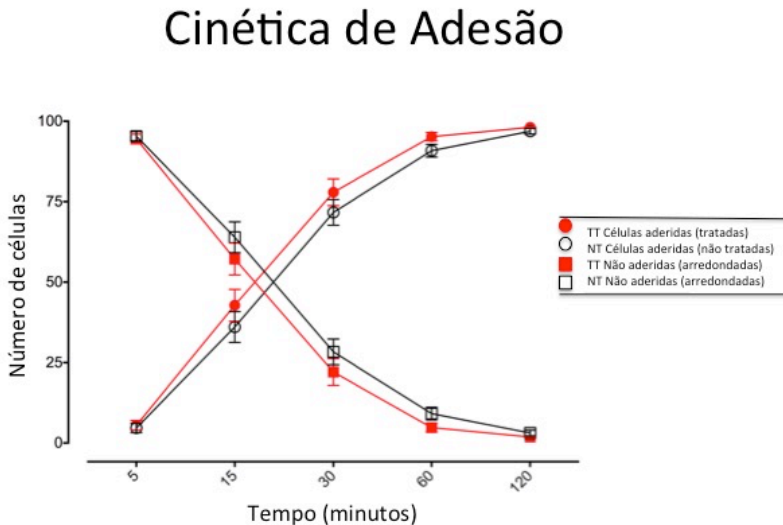
Figura 26. Figura do experimento de adesão realizado com amostra de *EACv*



Fotografias representativas do efeito do *EACv* na cinética de adesão e espalhamento das HUVEC, sob diferentes substratos. Fotos representativas dos campos contados, mostrando ausência de diferenças no padrão de adesão. Retângulos menores representam aumento de resolução.

Baseando-se nos resultados acima, foi avaliado a cinética no tempo de adesão e o comportamento das células nas matrizes de colágeno e fibrina sob efeito dos extratos. As HUVEC foram cultivadas e analisadas nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos (Gráfico 14).

Os resultados indicam uma similaridade de velocidade de adesão das HUVEC cultivadas sobre a matriz de colágeno e sobre a matriz de fibrina (dados não mostrados). Uma pequena diferença (15 a 30 minutos) é percebida entre as HUVEC não tratadas (NT) - controle, e as tratadas (TT) com *EACv*, entretanto, estes valores não demonstraram diferença estatística.

Gráfico 14. Gráfico da cinética de adesão das HUVEC tratadas com *EACv*.

Atividade do *EACv* na cinética de adesão de matriz de fibrina (bola) e colágeno (quadrado). Experimentos realizados em triplicata e resultados expressos em número de células pelo tempo. Diferenças significativas não foram visualizadas entre os dois tipos de matrizes.

h. Organização do citoesqueleto de HUVECs por imunohistoquímica

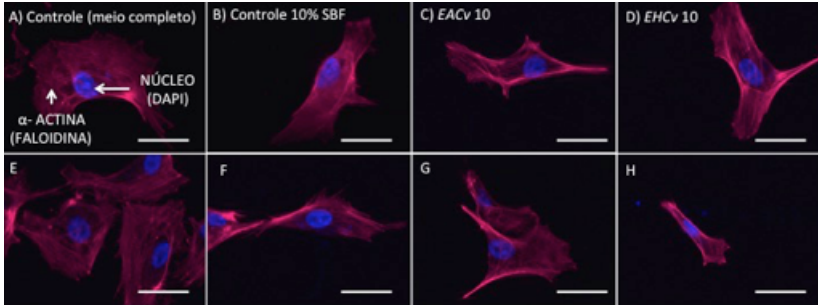
Considerando a ação inibitória dos extratos *EACv* e *EHCv* evidenciada sobre a migração celular de HUVEC, e os efeitos observados sobre os movimentos de brotamento, a estrutura do citoesqueleto e morfologia das células endoteliais foram examinadas.

As marcações de α -actina e tubulina foram analisadas em condições ótimas para as células (M199 completo) – controle positivo, M199 *starving* (10% SBF) - controle, em VEGF (10% SBF), e com os extratos isolados e associados ao VEGF (10% SBF), por 24 horas.

Os resultados da análise da distribuição e arranjo das fibras de α -actina (Figura 27) mostram, no controle, uma distribuição por toda a extensão da célula, assim como nos demais tratamento. Na condição ideal para crescimento das HUVEC, é possível observar uma morfologia

mais aderente comparativamente aos demais tratamentos. Contudo, nenhuma alteração significativa no arranjo das fibras de actina foi detectado nos 10 campos microscópicos analisados.

Figura 27. Fotografias demonstrando a fibra do citoesqueleto α -actina, de HUVEC, tratadas por 24h com os extratos de *C. verticillata*.

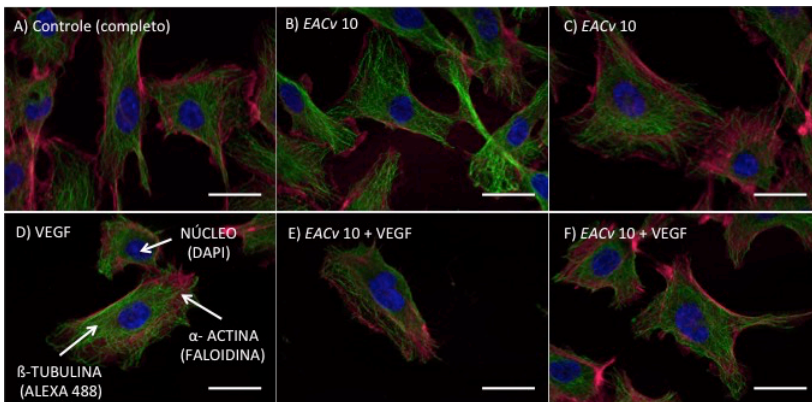


Fotografias representativas de células endoteliais positivas para α -actina (Faloidina; vermelho) e núcleo (DAPI; azul) (A-H). M199 completo usado como controle positivo (A e E); M199 com 10% SBF (*starving*) - controle negativo (B e F), e tratamentos com *EACv* (C e G) e *EHCv* (D e H) realizados em meio *starving*. Imagens de A – D mostrando células isoladas, e E-G células em contato. Aumento de 63x em microscópio fluorescente Axiovert 200M Zeiss (Carl Zeiss). Barra: 5 μ m.

Na sequência avaliou-se os microtúbulos do citoesqueleto das HUVEC, nas condições supracitadas, e se poderiam estar sofrendo alguma ação por parte dos extratos. Assim, marcações para α -actina (vermelho) e tubulina (verde) conjuntamente foram realizadas, conforme indicado nas figuras 28 e 29. A figura 28 apresenta imagens de campos de microscopia analisando as células isoladas e, na figura 29 as análises foram realizadas verificando as células agrupadas.

A análise dos campos, nas condições de tratamento com os extratos permitiu verificar a presença de algumas células que pareciam diminuir o número de fibras de actina associadas a uma desorganização da tubulina, quando comparadas ao controle com M199 completo. Entretanto, o número de células que apresentavam este padrão não foi significativo.

Figura 28. Fotografias representativas demonstrando as fibras do citoesqueleto α -actina e tubulina, de HUVEC isoladas, tratadas com os extratos de *C. verticillata*

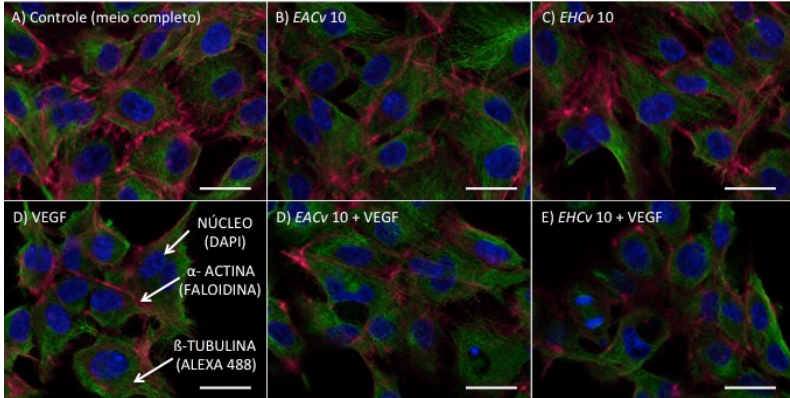


Fotografias representativas de células endoteliais positivas para α -actina (vermelho), tubulina (verde) e núcleo (DAPI = azul), indicando o meio completo (NTcompleto) como controle ; M199 com 10%SBF, meio starving - controle negativo, e tratamentos com extratos realizados realizados em meio starving para obtenção da melhor resposta celular. Aumentos de 63x em microscópio fluorescente Axiovert 200M Zeiss (Carl Zeiss). Barra: 5 μ m.

HUVEC isoladas ou agrupadas, tratadas por 24 horas demonstraram um padrão de morfologia e arranjo de actina e tubulina similar em todas as condições testadas, evidenciando inclusive pontos de contato célula-célula (Figura 29) quando aderidas a outras células do campo.

Os resultados mostraram um mesmo padrão de organização de filamentos do citoesqueleto, de adesão, de morfologia e de espalhamento (*spreading*), tanto nos grupos de tratamento com células isoladas quanto nos de células agrupadas. Portanto, nas condições estabelecidas para o ensaio, em 24h de tratamento, não foi verificado nenhuma alteração no citoesqueleto, que pudesse explicar o comportamento de inibição observados nos ensaios de brotamento de capilares e/ou de migração celular.

Figura 29. Fotografias demonstrando a fibra do citoesqueleto α -actina e tubulina de HUVEC agrupadas, tratadas com os extratos.



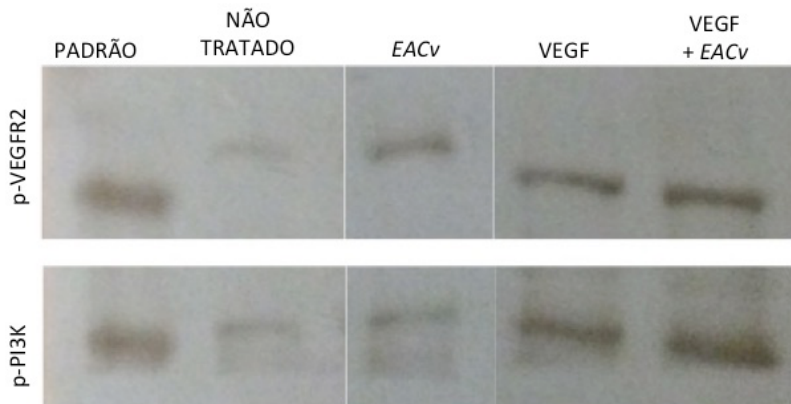
Fotografias representativas de células endoteliais positivas para α -actina (Faloidina; vermelho), tubulina (Alexa 488; verde) e núcleo (DAPI = azul), indicando o comportamento das HUVEC quando agrupadas. Aumentos de 63x em microscópio fluorescente Axiovert 200M Zeiss (Carl Zeiss). Barra: 5 μ m.

i. Avaliação da atividade do EACv na fosforilação de receptores da via do VEGF

Tendo vista os resultados anteriores investigou-se o nível de fosforilação de VEGFR2 da célula endotelial a uma possível sinalização intracelular.

Na figura 30, é possível verificar que o EACv parece também não influenciar a fosforilação do receptor de VEGF (KDR), assim como também não atua bloqueando especificamente a fosforilação da cinase PI3K.

Figura 30: Fotografia do gel do ensaio de *Western Blotting*



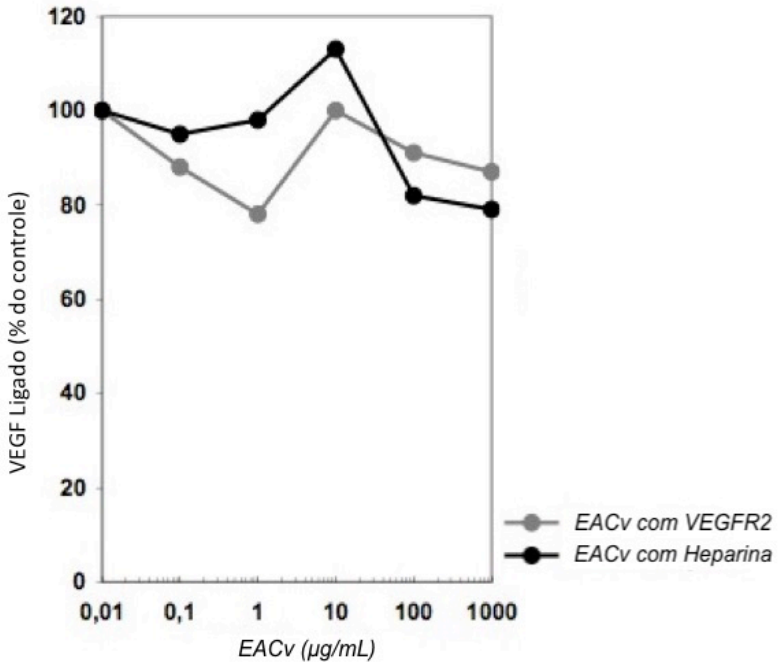
Fotografia do gel de agarose. As bandas demonstram a ausência de alteração da expressão da fosforilação do receptor VEGFR2 e de PI3K sob tratamento de 2h com o *EACv* isolado e coadministrado com VEGF. O ensaio foi realizado em duplicata.

j. Avaliação do EACv na interação com receptores de células endoteliais

Na sequência buscamos caracterizar a possível influência do *EACv* sobre a interação entre VEGF com a heparina (i.e, a um componente polissacarídico heparinóide, de glicosaminoglicanos da matriz extracelular endotelial), bem como na interação entre VEGF-A com VEGFR2.

O VEGF-A (30 ng/mL) se liga especificamente ao VEGFR2 e à heparina imobilizada num chip sensor Biacore, mas não na superfície utilizada como controle. O VEGF-A foi então injetado sozinho ou na presença de concentrações crescentes de *AECv*, nas duas diferentes faces do chip sensor. A resposta foi registrada no final da injeção, e os dados de ligação foram expressos como uma porcentagem do VEGF-A ligado à superfície. Como mostrado na Figura 30, o *EACv* não foi capaz de inibir a interação entre o VEGF / KDR, assim como a interação do VEGF-A com heparina imobilizada, em qualquer das concentrações testadas.

Gráfico 15: Gráfico da interação de VEGF-A com seus receptores KDR e Heparina, sob ação do *EACv*.



O VEGF-A foi injetado sobre um chip sensor coberto por VEGFR2 (KDR) - ou heparina Biacore na presença de concentrações aumentadas de *EACv*. Os dados foram expressos como porcentagem de VEGF-A ligado nas duas diferentes superfícies com respectivos receptores. O ensaio foi realizado em triplicata.

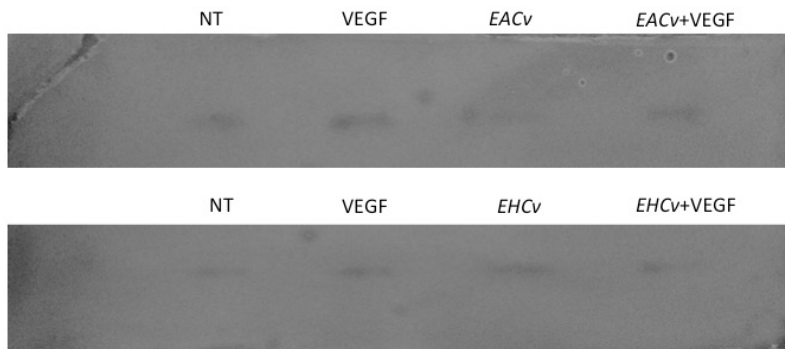
k. Atividade dos extratos na atividade enzimática

A zimografia é um ensaio que permite a visualização de enzimas em amostras biológicas, baseando-se na degradação de um substrato copolimerizado. Em nosso estudo foi utilizado gel de agarose e como substrato para degradação do plasminogênio, o leite à 20% (DANO et al., 1985). O ensaio foi realizado para investigar se os extratos de *C.*

verticillata (*EACv* e *EHCv*) estariam induzindo a expressão das enzimas com atividade proteásica da plasmina produzida pelas células endoteliais, cuja conversão, é realizada através da liberação dos ativadores do plasminogênio, como o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) e o ativador de plasminogênio uroquinase (u-PA), que agem sobre o plasminogênio durante o processo de angiogênese (MIGNATTI & RIFKIN, 1993; WERB, 1997). Uma vez que a degradação da matriz constitui uma importante etapa na ocorrência do processo angiogênico por brotamento, a atuação de enzimas de conversão do plasminogênio torna-se um evento crítico.

Os dados obtidos no ensaio de zimografia (Figura 31) demonstram que a conversão do plasminogênio em plasmina não apresentou diferenças significativas entre as amostras, ou seja, o extrato não induziu uma maior expressão das enzimas conversoras. Portanto, sendo a plasmina uma enzima de papel crucial na invasibilidade do tecido circundante, a sua baixa expressão indica que o tratamento com os *EACv* e *EHCv* não influencia a degradação da matriz, reportada na etapa 1 (Figura 5) do processo de formação de vasos.

Figura 31: Fotografia do gel de gelatina com 20% de leite, ensaio de zimografia.



Gel de agarose com 20% de leite. As bandas demonstram a degradação do substrato pelo plasminogênio, que deixa o gel transparente onde a proteína se faz presente. O ensaio foi realizado em triplicata.

7 DISCUSSÃO

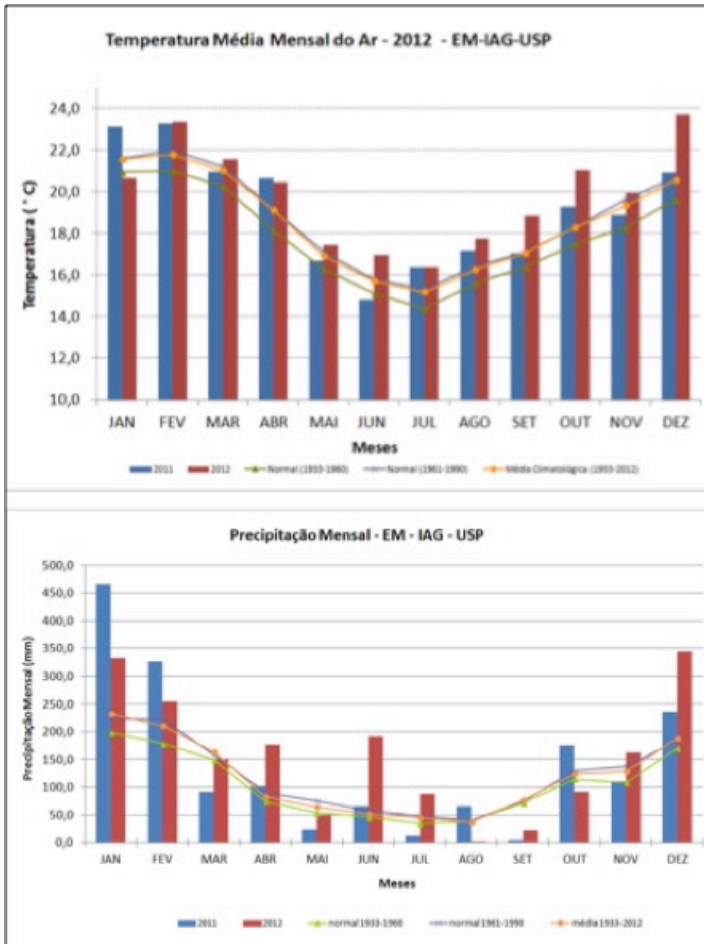
A demanda crescente do uso de espécies vegetais como plantas medicinais gera a necessidade de conhecimentos sobre as respectivas propriedades fitoquímicas e farmacológicas voltadas à definição da eficácia e de limites de segurança relativas a esses recursos fitoterápicos (REDDY et al., 2003; WANG et al., 2004). Como parte desse desafio em escala global, o presente estudo dedicou-se a investigar atividades biológicas relacionadas à formação de vasos sanguíneos, a partir de extratos foliares obtidos da espécie vegetal *C. verticillata* L, utilizada como planta medicinal pela população em função, principalmente, das propriedades hipoglicemiante e antiinflamatória.

O uso de espécies nativas e medicinais é muito comum no Brasil apresentando, por vezes, diferentes formas de uso e indicações. A espécie *C. verticillata* segue esse padrão onde, por exemplo, na região paraense é etnofarmacologicamente utilizada como adjuvante no tratamento de acidentes vasculares cerebrais (Barbosa et al., 2002), enquanto nos estados de Minas Gerais e Paraná é conhecida pelo uso do chá em função das propriedades antidiabéticas (SILVA et al., 1996; BELTRAME, 2001). Dai ser reconhecida popularmente como “insulina vegetal”. De fato, a literatura tem reportado diversas propriedades farmacológicas dos extratos de *C. verticillata*, incluindo especialmente as atividades hipoglicemiante, antidislipidêmica, antioxidante e antiinflamatória (VIANNA et al, 2004; BELTRAME et al, 2001; KHALIL et al, 2008; FERREIRA et al, 2008 e QUILEZ et al, 2007).

Uma diferença quantitativa no teor de flavonoides nas diferentes estações indicou a influência das instabilidades climáticas ocorridas no decorrer do ano de 2012 nos resultados encontrados.

O ano de 2012 destacou-se pelo alto índice pluviométrico e de altas temperaturas. A temperatura média anual (19,9°C) correspondeu a um aumento de 1,3°C da média climatológica, com destaque para o registro de um recorde absoluto de 35,9°C (outubro) frente à 35,6°C (dezembro) de 1940. Os gráficos apresentados, dados da Estação Meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo, demonstram a temperatura e precipitação ocorridas no ano.

Gráfico 16: Temperatura média mensal do ar e precipitação mensal acumulada para os anos de 2011 e 2012, além das normais e médias climatológicas.



Temperatura média mensal do ar e precipitação mensal acumulada para os anos de 2011 (azul) e 2012 (vermelho), além das normais e médias climatológicas. Normais entre os anos de 1933-1960 (verde), e entre 1961-1990 (roxo), a média entre 1933 e 2012 é mostrada em cor laranja.

No presente estudo, a partir da identificação de conteúdos sazonais de compostos flavonoides totais nos extratos aquoso (*EACv*) e hidroalcolólico (*EHCv*) de *C. verticillata*, esses extratos foram avaliados sobre modelos *in vivo* e *in vitro* para avaliação de seu efeito sobre a formação de vasos sanguíneos. Os resultados demonstraram uma ação antiangiogênica e antivascularizante (quando administrados isoladamente) *in vivo* em embriões de galinha (Figura 20) e ação bloqueadora da angiogênese induzida por VEGF, em camundongos adultos (Gráfico 6). Em embrião de *D. rerio* (Figura 22) foi possível verificar uma ação anti-angiogênica transitória, relacionada *in vitro* principalmente à inibição de brotamento (*vessel sprouting*) e de alongação de microvasos e à atividade citotóxica em células endoteliais da veia umbilical humana – HUVEC (Gráficos 7 e 9).

As primeiras caracterizações fármaco-químicas e toxicológicas de extratos da espécie *C. verticillata* foram reportados em meados dos anos 80 (COSTA et al., 1990; SILVA et al., 1993, LIZANA et al., 2000) e identificaram a presença de flavonoides na planta, achados que corroboram os resultados das análises fitoquímicas dos extratos - *EACv* e *EHCv* (figura 6). Além destes resultados foi verificado (Tabela 1) que ambos os extratos apresentaram uma significativa atividade sequestrante do radical DPPH, indicando uma ação antioxidante que aponta para o supracitado teor de flavonoides, como também verificado na literatura (FERREIRA et al., 2008; KHALIL et al., 2008; LINO et al., 2008).

No que concerne ao potencial antioxidante dos flavonoides é reconhecida a importância nutricional desses compostos facilmente adquiridos em uma dieta de frutas e verduras, e que auxiliam na prevenção e desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas associadas, inclusive, a extensiva neovascularização. De fato foi verificado que alguns mediadores inflamatórios podem atuar na indução da expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF (KOCH, 1998), sendo essa inter-relação importante no contexto das doenças angiogênicas (FOLKMAN, 1995).

As condições determinantes de processos inflamatórios crônicos vem sendo consideradas também importantes no estudo (fisiopatológico) do descontrole da formação de vasos sanguíneos (angiogênese) (MOURA et al., 2009). Os resultados apresentados neste trabalho, identificaram a presença de ação antioxidante, possivelmente relacionadas a presença de compostos flavonoides, mas não demonstraram ação inibitória da proliferação celular, como aquela

demonstrada nas células endoteliais estimuladas com FGFb ou VEGF (FOTSIS et al., 1997; KIM., 2003). Entretanto, também foram verificados os resultados em modelos *in vivo*, uma inibição da angiogênese (FOTSIS et al., 1997, KIM, 2003). Estudos prévios, demonstram ainda, atividade dos flavonoides sobre a migração celular e na modulação da desorganização da membrana basal (REN et al., 2003), diferentemente dos resultados observados nas condições estabelecidas neste trabalho.

No entanto, deve ser igualmente considerado que muitos outros compostos químicos, com ação antiangiogênica, foram descritos em extratos de *C. verticillata*, como por exemplo, o β -sitosterol, o resveratrol e a quercetina (LIZANA et al., 2000; BELTRAME et al., 2001; 2002; LUCENA et al., 2010; QUÍLEZ et al., 2004).

Uma primeira abordagem sobre a ação dos extratos de *C. verticillata* na angiogênese foi realizada com base na avaliação de viabilidade celular, utilizando-se a linhagem HUVEC, através do método colorimétrico do MTT. Os resultados desses ensaios mostram que ocorreu uma redução significativa da viabilidade celular nessa linhagem endotelial, no período de 24 a 48 horas de exposição ao *EACv* e ao *EHCv*. Esses achados estão de acordo com aqueles descritos por Lucena e colaboradores (2009) tendo sido referidos como uma atividade citostática moderada do *C. verticillata* em células Hep-2.

Os extratos aquoso e hidroalcoólico de *C. verticillata* (*EACv* e *EHCv*; 1 – 100 $\mu\text{g/mL}$; em períodos de 24 e 48 horas de tratamento) inibiram a viabilidade de células da linhagem HUVEC. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ o *EACv* - amostra de primavera, durante um período de apenas 24 horas de exposição, foi capaz de reduzir em até aproximadamente 80% a viabilidade celular ($p < 0,01$; Gráfico 9) evidenciando assim um potencial citotóxico sobre essas células. Tais achados corroboram com os resultados *in vivo* encontrados no teste da *YSM*, onde se verificou a inibição da vasculo-angiogênese (Gráfico 2) pelos extratos quando administrados isoladamente e/ou em associação ao fator pró-angiogênico (FGFb). É importante notar que, de um modo geral, o *EHCv* foi mais efetivo que o *EACv* na redução da viabilidade celular durante um período de 48 horas de exposição (Gráfico 8).

Como descrito na página 17, no tópico 1.5, a ausência de equilíbrio fisiológico no processo de angiogênese está implicada na ocorrência de diversas patologias e, na embriogênese, pode influenciar comprometendo principalmente o crescimento do embrião (Carmelliet,

2003). Nesse contexto, os resultados do presente estudo mostram que os extratos aquoso e hidroalcoólico de *C. verticillata* inibiram a formação de vasos sanguíneos iniciais nas membranas do saco vitelínico e corioalantóica de embriões de galinha de 4 e 8 dias de desenvolvimento, respectivamente. O ensaio da membrana corioalantóica (*CAM Assay*) tem a vantagem de na idade de 7-8 dias de desenvolvimento a resposta inflamatória está ausente, o que auxilia no controle das condições de avaliação da formação dos vasos sanguíneos (RIBATTI et al, 1996 e 1999; STATON et al, 2004).

O *YSM assay* permitiu distinguir entre microvasos formados e aqueles vasos vitelínicos primordiais, já presentes no segundo dia embrionário do desenvolvimento do embrião de galinha doméstica (E2) sob ação de fatores diferentes durante o desenvolvimento. Assim, o *YSM assay* permitiu avaliar a ação inibitória de extratos e compostos isolados sobre a vasculogênese e a angiogênese inicial na membrana vitelínica (*YSM*) (GAGLIARDI et al, 1998; DIAS et al., 2005 e 2008; YI et al, 2015).

De fato, a administração de 100 µg/mL de *EACv* e *EHCv* foi capaz de reduzir em aproximadamente 45% a formação de vasos sanguíneos na vesícula vitelínica (*YSM*) e na membrana corioalantóica (*CAM*), respectivamente, quando administrados isoladamente. Além disso, tanto o *EACv* como o *EHCv*, administrados em associação com o FGFb (*YSM*) reverteram o conhecido efeito pró-angiogênico desse fator de crescimento. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado na associação dos extratos com VEGF-A, no modelo da *CAM*.

Diferentemente dos modelos anteriores, no modelo de angiogênese de embriões (i.e, angiogênese intraembrionária e não de vasos extraembrionários) de *D. rerio* (Figura 20), este comportamento não apresentou uma relevância estatística. As imagens (Figura 21 e 23) indicam particularmente o momento em que vasos sanguíneos (artérias intersegmentares; ISVs) são formados *in vivo* a partir de brotamentos angiogênicos consecutivos no sentido céfalo-caudal, derivados da aorta dorsal na região truncal, auxiliando na compreensão de numerosos genes conservados em diferentes grupos animais.

Sendo o desenvolvimento de vasos primitivos do embrião um processo bem caracterizado, as análises de mutações que afetam seu desenvolvimento permite um acessível monitoramento na identificação de possíveis agentes antiangiogênicos (STATON et al, 2004). O modelo permite ainda, mesmo que os processos de vasculogênese e angiogênese

não sejam bem delimitados espaço temporalmente, no *D. rerio*, distinguir a formação dos vasos uma vez que a aorta dorsal e veia cardinal posterior mostraram ser formadas por vasculogênese (ZHONG et al, 2001); e que os vasos intersegmentares (ISVs) e os intersomíticos, que brotam da aorta dorsal, acredita-se serem formados por angiogênese, em 20 horas pós fertilização (hpf) (ISOGAI et al., 2001).

Serbedzija e colaboradores (1999) demonstraram que inibidores dos receptores de tirosina cinases bloqueiam a angiogênese, por meio de ensaios colorimétricos usando linhagens transgênicas de zebrafish, como os utilizados no nosso estudo *tg* KDR:GPF (Flk-1/VEGFR2) e *tg* Flt-1 (VEGFR2), para avaliar o efeito dos extratos na modulação dos receptores de VEGF na formação dos vasos sanguíneos do zebrafish. Também já foi demonstrado que extratos de outras plantas, como a canela, inibem a angiogênese em zebrafish via receptores de VEGF mediados por cinases. Entretanto, os resultados demonstrados neste trabalho não mostraram diferenças na expressão destas proteínas.

Os resultados expressos na figuras 20 e 21, mostram que ambos os extratos de *C. verticillata* (*EACv* e *EHCv*; 0,1 – 10 µg/mL) inibiram a angiogênese intersomítica, a partir da aorta dorsal, de alguns embriões de *D. rerio*, no estágio de 13 somitos. Sugerindo que na vasculatura intraembrionária os efeitos antiangiogênicos podem ser similares aos verificados em membranas extraembrionárias (anexas) de embriões de *G. domesticus*. A administração 10 µg/mL de *EACv* ou *EHCv* também apresentou um bloqueio parcial da angiogênese na aorta do peixe (Figura 21), de modo similar ao observado no grupo tratado com o inibidor angiogênico (SU5416; controle positivo). Após o período de tratamento, porém, foi possível notar uma normalidade do padrão de desenvolvimento destes embriões.

A análise morfo e biométrica realizada nos embriões de *G. domesticus* (E4) apontou prejuízos no crescimento, i.e, redução significativa no comprimento dos embriões dos grupos expostos aos extratos (Gráfico 5). Tal atraso no desenvolvimento pode ser interpretado como uma consequência deletéria direta da condição de redução de vasos, em razão de uma possível ação antivasculo-antiangiogênica dos extratos, na vasculatura extraembrionária (MOORE & PERSAUD, 2008). Da mesma forma, os embriões de zebrafish submetidos aos extratos no ensaio de angiogênese apresentaram atraso correspondente a aproximadamente 3 horas no respectivo

desenvolvimento (Figura 20 e 21). O atraso do desenvolvimento e uma diminuição das medidas dos embriões poderiam ser respondidas se os extratos estivessem atuando sobre a sinalização Notch. Notch é uma das vias ativas para a formação dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento, tendo inclusive como alvo receptores de VEGF (Copeland et al., 2011). Este sendo também importante no processo de somitogênese.

Portanto, com base nas características específicas em que esse ensaio do zebrafish foi realizado, os resultados relativos à inibição do crescimento dos embriões de peixe, descritos acima, passaram a ser interpretados como uma tendência apenas ao retardo no crescimento, e considerados então sem relevância, ou significado estatístico. Por outro lado, diferentemente do que foi relatado em um estudo prévio (ALMEIDA et al, 2007), os modelos de estudo de inibição da formação de vasos sanguíneos e de morfometria de embriões não mostraram a ocorrência de efeitos embriotóxicos ou anomalias congênitas aparentes nos grupos tratados com *EACv* ou *EHCv*, nas condições experimentais descritas no tópico - Metodologia.

Conforme os resultados apresentados (Figura 22) a técnica de hibridização *in situ* permitiu investigar se expressão gênica específica de RNA ou proteínas de moléculas adesivas envolvidas no processo de angiogênese (HAFFTER et al., 1996) sofreu alteração após tratamento com os extratos. Uma melhor compreensão dos principais mecanismos de desenvolvimento embrionário enfatizando aqueles relacionados à morfogênese do sistema vascular (LAWSON et al., 2000) permite elucidar o mecanismo de ação do extrato. Segundo Montero-Balanguer e colaboradores (2009), VE-caderina tem um papel fundamental no desenvolvimento vascular, demonstrando inclusive que na ausência ou deficiência da proteína, as junções aderentes são desestabilizadas, impedindo maturação dos vasos e causam fragilidade capilar, resultando em hemorragias e prejuízo ao animal. Todavia, os resultados não indicam ocorrência de alterações na expressão de proteínas de adesão celular VE-caderina (Figura 3), proteína transmembranares endotélio-específica, que estabiliza as conexões entre as células endoteliais permitindo o alongamento do broto e posterior remodelamento vascular (DEJANA, 2004). Foi possível verificar, portanto, que o *EACv* não foi efetivo na desestabilização das junções, nas condições especificadas na Metodologia.

Também a expressão gênica de Hlx-1, cujo potencial *in vitro* reside na sobrevivência e proliferação das células endoteliais, não foi modificada (HERBERT et al., 2012). A expressão do gene Hlx-1 tem sua expressão verificada na placa precordial durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (FJOSE et al, 1994), mas recentemente foi verificada especificamente durante o *sprouting* angiogênico das veias intersegmentares e intersomíticas (HERBERT et al., 2012). No presente estudo, foi injetado morfolino de VEGF em embriões porém novamente sem resultados conclusivos em razão da falta de significância estatística, muito embora tenha sido observado um nível de resposta inibitória importante em alguns exemplares de embriões, como mostrado na figura 23.

Nos embriões de *D. rerio* se observa uma tendência à inibição da angiogênese em todos os grupos expostos ao *EACv* não injetado e injetados com morfolino de VEGF. Em contraste com os nossos resultados, estudos prévios apontam para a significativa inibição da angiogênese com base nessa técnica decorrente da administração de outros flavonoides, a exemplo caso da quercetina (JEON et al, 2007; ZHAO et al., 2014), resveratrol (BRAKENHIELM; CAO; CAO, 2001) substância esta também presente no *C. verticillata*, conforme anteriormente descrito por Beltrame e colaboradores (2002).

A ação inibitória dos extratos (administrados isoladamente) sobre a vasculo-angiogênese no desenvolvimento, verificada nos modelos realizados com anexos embrionários e embriões de galinha e peixe, não se reproduz no modelo de angiogênese avançada, em camundongos adultos. Como descrito anteriormente, nesse ensaio a angiogênese de reparo tecidual é expressa como o teor de hemoglobina presente no plug de implantado na região subcutânea do dorso dos animais, e os *plugs* contendo 10 µg/mL de *EACv* ou *EHCv* (Gráfico 6) co-administrados VEGF-A (50 ng/mL), apresentou o potente efeito pró-angiogênico parcialmente revertido de modo significativo.

É digna de nota a resposta inibitória constatada em diferentes modelos de estudo, naqueles ensaios em que os extratos de *C. verticillata* foram co-administrados com o fator de crescimento angiogênico. Conforme o descrito nos resultados desses ensaios (Gráfico 2, 3, 5, 6 e figuras 20 e 24), as respostas de inibição do processo de formação de vasos sanguíneos pelos extratos foram expressas no sentido de que *EACv* e/ou *EHCv* reverteram o efeito pró-angiogênico do FGFb e do VEGF-A.

Diante dessas evidências torna-se plausível propor que, nas condições supracitadas, quando administrados em presença do VEGF-A ou do FGFb, os extratos exerçam ação antiangiogênica de um modo significativamente efetivo, e que conforme demonstrado, tal ação diferenciada esteja diretamente relacionada à interação (ou arranjo formado) entre constituintes químicos do extrato (*EACv* e *EHCv*) e as moléculas do fator de crescimento angiogênico (VEGF-A ou FGFb), no microambiente da célula endotelial. No entanto, é importante salientar que os resultados apresentados nesta tese, foram realizados com base nas propriedades do metabolismo secundário de *C. verticillata*. Sugere-se que um novo corpo de evidências sobre as atividades farmacológicas deva ainda ser clarificada em estudos que abordem também os constituintes primários e estruturais destas plantas, como polissacarídeos (VIEIRA et al, 1992; LIZANA et al , 2000).

Primeiramente foi realizado o ensaio de brotamento (*vascular sprouting*) e crescimento de microvasos em substrato constituindo uma sensível e versátil ferramenta de fácil execução e alta reprodutibilidade para analisar compostos pró e anti-angiogênicos (HEISS et al., 2015).

Os resultados indicaram uma inibição significativa de ambos extratos (Gráfico 9), no brotamento estimulado por VEGF e FGF. Os resultados corroboram com os ensaios *in vivo* supracitados, que também reverteram a ação pró angiogênica destes mesmos fatores (Gráfico 2, 5 e 6). Os resultados obtidos a partir da exposição à 10 µg/mL de *EACv* (Gráfico 9 e 10) referentes à consistente inibição de 40% em gel de fibrina e 40% em gel de colágeno no brotamento e alongação de microvasos a partir de HUVEC estimuladas por VEGF-A ou FGFb, se somam às evidências anteriores, obtidas *in vivo*, conferindo um suporte adicional à idéia de uma preponderância da interação dos extrato de *C. verticillata*, nas respostas de modulação negativa da angiogênese.

Tendo em vista os resultados alcançados com os modelos de estudo da angiogênese *in vivo*, buscamos então elucidar o mecanismo de ação inibitória dos extratos (*EACv* e *EHCv*), avaliando a ação dos extratos sobre eventos celulares que subsidiam esse processo de formação de vasos sanguíneos, ou seja, proliferação, migração, adesão e morte celular, bem com, a atividade enzimática de degradação da matriz extracelular endotelial, e o processo morfogenético de tubulogênese vascular.

Como já descrito no tópico – Resultados desta tese, as respostas obtidas nos ensaios de proliferação celular de HUVEC em cultura

primária (Gráfico 12), determinação do perfil de morte celular por citometria de fluxo (Tabela 3), migração (Figura 25), adesão sobre diferentes componentes de matriz extracelular (substratos contendo colágeno-I, fibronectina, ou fibrinogênio) e *spreading* (Gráfico 13 e Figura 26), de cinética de adesão (Gráfico 14), avaliação do citoesqueleto (Figura 28, 29 e 30), tubulogênese (Gráfico 11), avaliação da atividade proteásica por zimografia (Figura 31) e a fosforilação de receptores de VEGFR2 (Figura 30), não foram conclusivas, tendo resultado estatisticamente não-significativos nas condições estabelecidas nos protocolos descritos na Metodologia.

No entanto, de um modo distinto desses últimos resultados, a exposição das células (HUVEC) durante um período de 24 horas ao *EACv* (somente na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$) concomitantemente ao VEGF-A (co-tratamento) foi efetiva em reverter o efeito desse fator angiogênico sobre a migração, expressa em porcentagem de fechamento da cicatriz produzida na monocamada das células endoteliais em cultura.

A matriz extracelular tem um papel crucial na cicatrização de feridas, e esta envolvida em importantes processos celulares. Dentre seus vários componentes destacam-se a fibronectina (FN – $\alpha 5\beta 1$) e colágeno (COL – $\alpha 1\beta 1$), que interagem especificamente com diferentes células através de moléculas de integrinas de receptores especializados de membrana (BISCHOFF, 1995; HOELZLE; SVITIKINA, 2011). A interação entre célula e matriz é fundamentalmente realizada através do citoesqueleto, portanto, analisar o comportamento o comportamento destas moléculas, traz dados relevantes sobre a atividade migratória e outros aspectos do comportamento celular de HUVEC (HOELZLE & SVITIKINA, 2011).

As fibras de α -actina e β -tubulina do citoesqueleto associados a demais proteínas presentes nas células endoteliais apresentam função vital na adesão célula-célula e célula-matriz. Hoelzle e Svitkina (2011) mostraram que a interação inicial entre as HUVEC é realizado pelos filopódios, protusões conectadas pelas moléculas adesivas de VE-cad. Por outro lado, Zahra e colaboradores (2014) demonstraram que um prejuízo na interação das fibras do citoesqueleto pode acarretar em complicações aos pacientes diabéticos, como o aumento da resposta inflamatória e danos cardiovasculares.

Considerando o efeito inibitório do *EACv* verificado sobre a migração de células endoteliais, investigou-se a organização das fibras do citoesqueleto de células da linhagem HUVEC por meio da técnica de

imunohistoquímica, utilizando-se como marcadores, α -actina e β -tubulina, realizada de acordo com a descrição detalhada no tópico – Material e Métodos. Os resultados (Figuras 27, 28 e 29) mostram que em células endoteliais, expostas durante 24 horas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de *EACv* ou *EHCv*, não houve diminuição no número de ambas as fibras, e ou uma desorganização. Portanto, nas condições estabelecidas para o ensaio, não foi possível confirmar uma alteração no citoesqueleto que justificasse a inibição apresentada no ensaio de migração celular em monocamada de HUVEC (Figura 25) ou brotamento em esferóides (Gráfico 9 e 10).

Avaliando a última etapa do processo de brotamento, a tubulogênese, usou-se um gel tridimensional como substrato, em placa de μ -slide, específica para ensaios que visam mimetizar *in vitro* o comportamento das HUVEC no microambiente celular *in vivo*. O gel constituir-se de uma substância rica em laminina-1, extraída da matriz extracelular de células do tumor Engelbreth-Holm-Swarm de camundongos (KLEIMANN et al., 1986) forma um arcabouço ideal para a formação dos *loops* de células. Entretanto, os resultados do efeito do *EACv* isolado ou coadministrado com VEGF não mostrou diferença significativa no número de *loops* formados.

Diante desse cenário, passou-se a considerar a possibilidade de que os extratos estivessem agindo diretamente sobre a sinalização da célula endotelial (HUVEC), a nível de membrana e citoplasma, e desta forma indiretamente no processo de angiogênese. Essa nova abordagem focou inicialmente em ensaios voltados à resposta modulatória da fosforilação do VEGFR2 e do PI3K, na via de sinalização das HUVEC responsivas ao estímulo de VEGF-A. Inicialmente, o ensaio de *Western Blotting* relativo à análise de perfil de fosforilação do receptor KDR, e da proteína cinase PI3K (Figura 29) mostrou que a exposição de HUVEC ao *EACv* não inibiu a fosforilação a nível de membrana e nem a nível de citoplasma. As imagens do tratamento com o *EACv* parecem indicar a ocorrência de algum grau de fosforilação de ambos os receptores, principalmente quando o extrato é associado ao VEGF. Tal interpretação também nos permitiria especular sobre a possibilidade de que o extrato (2 horas de exposição) pudesse potencializar o efeito do VEGF/PI3K promovendo, por exemplo (com base no disposto na Figura 7) a sobrevivência (via AKT), assim como, as atividades migratória e/ou proliferativa, via NOS/MAPK e PLC/ERK, respectivamente.

Embora os resultados do teste de proliferação celular de HUVEC (Gráfico 12), pudessem respaldar essa idéia, o mesmo não se poderia considerar com base nos resultados obtidos sobre a migração e de viabilidade celular nos ensaios de brotamento em esferóides e de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT (Gráficos 7 e 8). E, adicionalmente, com base nos resultados obtidos com a técnica de *binding* (Biacore) mostrados no Gráfico 15, onde se verifica uma tendência à redução de cerca de 20 % na ligação VEGF-KDR na presença de 1 µg/mL do extrato *EACv*, indicativo de uma ligação inespecífica.

Quando analisados no todo os efeitos de inibição relacionados a co-tratamentos (associação) com extratos e VEGF-A ou FGFb nos ensaios *in vivo*, também não deveria ser descartada a hipótese de uma possível atividade inibitória exercida por compostos do metabolismo primário do *EACv* (constituintes estruturais, a exemplo de polissacarídeos heparinóide), sobre o receptor angiogênico - VEGFR2 (KDR) e/ou sobre o respectivo complexo arranjo de proteoglicanas como HSPG (*e.g.*) na membrana da célula endotelial (NUGENT & IOZZO, 2001).

Com base nos resultados significativos alcançados por meio do presente estudo, a ação antiangiogênica tal como as numerosas propriedades de *C. verticillata* já descritas na literatura, pode vir a ser decisiva em prover, no futuro, novas alternativas farmacológicas para o controle de doenças tipicamente angiogênicas, assim como, o controle da diabetes e de inúmeras disfunções associadas a processos de caráter inflamatório crônico.

No entanto, diante da luz lançada pelos resultados deste estudo, presentemente é necessário concluir que, apesar de uma aparente ausência de toxicidade aguda de *C. verticillata* (FERREIRA et al., 2008), cuidados são especialmente recomendados em relação ao uso de extratos dessa espécie durante a gestação, com base nos efeitos abortivos e teratogênicos registrados em ratos (ALMEIDA et al., 2007). Da mesma forma que os achados do presente estudo, os efeitos vasoconstritores (GARCIA et al., 1997) e citotóxicos do *EACv* evidenciados por Saenz et al. (2000) e Vicentini et al. (2001) apontam para a importância da realização de estudos adicionais com vistas a se avaliar a segurança do uso terapêutico de extratos de *C. verticillata*.

Alguns aspectos de grande importância devem ser ressaltados neste trabalho. Primeiramente, em relação à diversidade de ensaios

disponíveis para o estudo da angiogênese, *in vivo*, que está justamente, nas especificidades e peculiaridades de cada um, no que concerne ao tipo de resposta angiogênica. Por esse motivo, os resultados obtidos na tese com um tipo de ensaio não foram generalizados, mas particularmente avaliados e complementados com outros tipos de ensaios que respondessem as questões relativas aos diferentes efeitos encontrados nos ensaios realizados.

Conforme citado na literatura, estudos desenvolvidos com plantas medicinais (chás, fitoterápicos e extratos) apresentaram expressivos achados, *in vitro*, em detrimento dos, *in vivo* com pouca ou negligenciadas atividades (KEZARWANI e GUPTA, 2013). Fato possivelmente explicado pela baixa solubilidade dos extratos ou constituintes, ou devido ao tamanho molecular inadequado das moléculas envolvidas, resultando, portanto, em uma baixa absorção e reduzida biodisponibilidade no tecido ou célula alvo (MANACH et al., 2004).

De forma contraditória, nossos resultados indicaram maior efeito de reversão de fatores pró angiogênicos nos ensaios *in vivo*, comparativamente aos *in vitro*. Característica explicada possivelmente pela ação sinérgica entre os diversos compostos presentes em um extrato (KESARWANI e GUPTA, 2013). É importante destacar que muitos princípios ativos, quando isolados, apresentaram ausência de atividades biológicas comparativamente aos seus extratos; e este preceito, do isolamento, vem ao encontro aos princípios holísticos de *Jun - Chen - Zuo - Shi* ou *furfang*, da medicina tradicional chinesa, onde “a totalidade prevalece sobre o segmento” (KESARWANI e GUPTA, 2013).

Portanto, os resultados deste trabalho contribuem de forma significativa na elucidação dos efeitos dos extratos de *C. verticillata* sobre a formação de vasos sanguíneos em diferentes modelos, trazendo uma contribuição mesmo que parcial na utilização dos extratos, especialmente o *EACv*, pela população brasileira. A contribuição deste trabalho com dados de eficácia, segurança e reprodutibilidade podem auxiliar futuramente a viabilização do desenvolvimento de um produto final. Portanto, estudos adicionais para estabelecer os mecanismos (vias bioquímica) subjacentes às ações antiangiogênicas de *C. verticillata* devem ser realizados.

E, enquanto as pesquisas não preenchem estas lacunas de conhecimento, segue-se a recomendação da *Angiogenesis Foundation*, que preconiza o estabelecimento do processo angiogênico normal

através do equilíbrio entre saúde e doença, entre a vida e a morte e especialmente através das nossas escolhas diárias. Desta forma nos beneficiaremos com uma formação dos vasos equilibrada e com muita saúde para todos.

8 CONCLUSÕES

- *EACv* e *EHCv* obtidos de *C. verticillata* apresentaram uma atividade sequestrante do radical DPPH, indicando uma possível ação antioxidante que se reflete no conteúdo de flavonoides desses extratos.
- *EACv* e *EHCv* reduzem significativamente a viabilidade celular da linhagem HUVEC, no período de 24 a 48 horas de exposição, evidenciando um potencial citotóxico sobre essas células.
- No período de 48 horas de exposição o *EHCv* foi mais efetivo que o *EACv* em reduzir a viabilidade celular de HUVEC.
- *EACv* e *EHCv* isolados inibiram a formação de vasos sanguíneos iniciais (vasculogênese e angiogênese) nas membranas do saco vitelínico e no modelo da membrana corioalantóica de embriões de *G. domesticus* de 4 e 8 dias de desenvolvimento (E4 e E8).
- Quando o *EACv* e o *EHCv* foram administrados em associação com FGFB (*YSM assay*) ambos os extratos foram capazes de reverter o conhecido efeito pró-angiogênico desse fator de crescimento.
- Os resultados acima concernentes à ação inibitória de *EACv* e *EHCv* sobre a vasculogênese e a angiogênese de desenvolvimento de embriões de *D. rerio* não foram representativos.
- A análise biométrica (comprimento CR) nos embriões de *G. domesticus* (E4), assim como em *D. rerio* (estágio 13 somitos); mostrou o prejuízo causado por ambos os extratos no crescimento, bem como um atraso no desenvolvimento, consequentes à possível ação antivasculo- e antiangiogênica desses extratos.
- A ação inibitória dos extratos administrados isoladamente sobre a angiogênese de desenvolvimento, nos modelos de embriões de

galinha e peixe não se reproduz no modelo de angiogênese avançada, em camundongos adultos.

- Quando os extratos são administrados de forma associada com VEGF-A ou o FGFb, o potente efeito pró-angiogênico desses fatores de crescimento é revertido de forma significativa, em camundongos adultos.

- Quando administrados associadamente ao VEGF-A ou FGFb (co-tratamentos), os extratos exercem ação antiangiogênica de um modo significativamente (mais) efetivo que nas respostas aos extratos administrados isoladamente.

- Sugere-se que a ação acima (mais efetiva) esteja diretamente relacionada à interação (ou arranjo formado) entre constituintes químicos do extrato (*EACv* e *EHCv*) e as moléculas do fator de crescimento angiogênico (VEGF-A ou FGFb), no microambiente da célula endotelial.

- Os efeitos inibitórios dos extratos coadministrados com VEGF-A ou FGFb sobre o brotamento e alongação de microvasos *in vitro* (esferóides) conferem um suporte adicional à idéia (acima) de uma interação entre “extrato e fator de crescimento nas respostas de modulação negativa da angiogênese.

- Em conjunto, os resultados referentes a inibição da vasculo-angiogênese, *in vivo*, estão relacionados principalmente à inibição *in vitro* (HUVEC) de brotamento (*sprouting*) e alongação de microvasos, e à atividade citotóxica dos extratos.

- Os resultados de inibição de crescimento embrionário (biometria) e os efeitos citotóxicos do *EACv* e *EHCv* apontam para a necessidade de estudos adicionais para que se possa melhor avaliar os mecanismos de ação, e a segurança e eficácia do potencial uso terapêutico de extratos de *C. verticillata*.

9 REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brasil. **Rev Brasil Farmacog**, v. 17, p. 114-40, 2007.

AIRD, W.C. Endothelial Cell Heterogeneity. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2(1) 2:a006429, 2012.

ALMEIDA, E.R. et al. Embriofetotoxic effect and offspring posnatl development exposed to hydroalcoholic fraction extract of *Cissus sicyoides* L. during wistar rats pregnancy. **J Medic Plants Res**, v. 1, n. 5, p. 109-12, 2007.

AMANN, R.; FUCHS, B.M. Single-cell identification by improved FISH. **Nat Rev Microbiology**, v. 6, p. 339-348, 2008. doi: 10.1038/nrmicro1888.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botan Brasilica**, v. 16(2), p. 189-203, 2002.

BANSODE, R.R. et al. Cinnamon extract inhibits angiogenesis in zebrafish and human endothelial cells by suppressing VEGFR1, VEGFR2, and PKC-mediated MAP kinase. **Food Scienc Nutrition**, v. 1, p. 74-82, 2013.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 16, p. 258-85, 2006.

BARBOSA, W.L.R. et al. Flavonoides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 12(Supl.), p. 13-15, 2002.

BELTRAME, F.L. et al. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Quím Nova**, v. 24 (6), p. 783-83, 2001.

BELTRAME, F.L. et al. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Braz Arch Biol Technology**, v. 45, p. 21-25, 2002.

BERG, M.E.V.D. Plantas medicinais da Amazonia: contribuição ao conhecimento sistemático. Belém: **Museo Paraense Emilio Goeldi**, 2ª Ed., p. 207, 1993.

BIKFALVI, A. et al. Biological roles fibroblast growth factor-2. **Endocr Reviews**, v. 18, p. 26-45, 1997.

BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trend Cell Biology**, v. 5, p. 69-74, 1995.

BOCK, K.; CAUWENBERGHS, S.; CARMELIET, P. Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. **Curr Opin Genet Development**, v. 21, p. 73-79, 2011.

BRAKENHIELM, E.; CAO, R.; CAO, Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. **FASEB Journal**, v. 15, p. 1798-800, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 971, de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, p. 9, 2006. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 30 jul 2014.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacology**, v. 100 (1), p. 131-4, 2005.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARLSON, B.M. Embriologia humana e biologia do desenvolvimento. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 479, 2014. ISBN 9788535275582.

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

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Medicine**, v. 6 (4), p. 389-95, 2000b.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nat Medicine**, v. 7, p. 575-83, 2001.

CARMELIET, P. Angiogenesis Modulations in cancer research: novel clinical approaches. **Nat Review**, v. 1, p. 415-26, 2002.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Medicine**, v. 9(6), p. 653-60, 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-36, 2005.

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

CAVALLARO, U., LIEBNER, S., DEJANA, E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. **Exp Cell Research**, v. 312(5), p. 659-67, 2006.

Cell Signaling Technology in Angiogenesis. Disponível em: < <http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp> > Acesso em: 16 set 2012.

CECHINEL,V.F; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím Nova**, v. 21, 1998.

CHAPMAN, S.C. et al. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. **Dev Dynamics**, v. 220, p. 284-89, 2001.

CHEN, Y.H. et al. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms, **Diabetes**, v. 56(6), p. 1559–68, 2007.

CHEN, P.L.; EASTON, A.S. Anti-angiogenic effects of resveratrol on cerebral angiogenesis. **Curr Neurovasc Research**, v. 8, p. 14-24, 2011.

CHUNG, A.S.; FERRARA, N. The Extracellular Matrix & Angiogenesis: Role of the Extracellular Matrix in Developing Vessels and Tumor Angiogenesis. **ECM & Angiogenesis**, v. 11, p. 135-46, 2010.

CIMPEAN, A.M., RIBATTI, D., RAICA, M. A brief history of angiogenesis assays. **J Dev Biology**, v.55, p. 377-82, 2010.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Review**, v. 89(4), p. 1177-215, 2009.

Copeland, J.N., Feng, Y., Neradugomma, N.K., et al. Notch signaling regulates remodeling and vessel diameter in the extraembryonic yolk sac. **BMC Dev Biol**, v. 11(12), p. 1-14, 2011.

CORREA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. IV, p. 130, 1926.

COSTA, C.M.M. Cipó-pucá (*Cissus sicyoides*). Apresentado no Curso de Especialização em Medicamentos da UFRJ. Manuscrito/ **Rio de Janeiro**, 1990.

COULTAS, L.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. **Nature**, v. 438, p. 937-45, 2005.

DANO, K. et al. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. **Adv Cancer Research**, v. 44, p. 139-266, 1985.

DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. **Nat Rev Mol Cell Biology**, v. 5, p. 261-70, 2004.

DE SPIEGELAERE, W et al. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. **J Vasc Research**, v. 49(5), p.390-440.

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

DEWITT, N. Angiogenesis: **Nat Insights**, v. 438(7070), p. 931, 2005.

DIAS, P.F. et al. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Canc Chemother Pharmacology**, v. 56, p. 436-46, 2005.

DIAS, P.F. et al. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivascuogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvasc Research**, v. 75, p. 34-44, 2008a.

DIAS, P.F et al. Tras-resveratrol inhibits early blood vessel formation (vasculogenesis) without impairment of embryonic growth. **J. Pharmacol Science**, v. 107(2), p. 118-27, 2008b.

DJONOV, V.G.; GALLI, A.B.; BURRI, P.H. Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. **Anat Embryology**, v. 202, p. 347-57, 2000.

DORAI, T.; AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agentes in cancer therapy. **Canc Letters**, v. 215(2), p. 129-40, 2004.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, H. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **Spect Studies**, v. 98, p. 719-33, 1932.

DULAK, J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agentes: hopes and reality. **J Physiol Pharmacology**, v. 56(1), p. 51-67, 2005.

DVORAK, H.F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathology**, v. 146, p. 1029-39, 1995.

- FAJARDO, L.F. et al. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. **Am J Pathology**, v. 140, p. 539-44, 1992.
- FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LE COUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat medicine**, v. 9, p. 669-76, 2003.
- FERRARA, N.; KERBEL, R.S. Angiogenesis as therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967-74, 2005.
- FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Medicine**, v. 5, p. 1359-64, 1999.
- FERRARI, G. et al. Transforming growth factor-beta 1 (tgf- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (vegf)-mediated apoptosis. **J Cel Physiology**, v. 219(2), p. 449-58, 2009.
- FERREIRA, M.P. et al. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170-74, 2008.
- FERRARA, N., HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Community**, v. 161, p. 851-58, 1989.
- FJOSE, A. et al. Expression of the zebrafish gene *hlx-1* in the prechordal plate and during CNS development. **Development**, v. 120, p. 71-81, 1994.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Adv Canc Res**, v. 43, 175-203, 1975.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chemistry**, v. 267(16), p. 10931-34, 1992a.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in Female Reproductive-Organs. **Faseb Journal**, p. 143-158, 1992b.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of Angiogenesis by Heparin and Other Sulfated Polysaccharides. **Adv Exp Med Biology**, v. 313, p. 355-364, 1992c.

FOLKMAN, J. The role of angiogenesis in tumor growth. **Semin Canc Biology**, v. 3(2), p. 65-71, 1992d.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Medicine**, v. 1(1), p. 27-31, 1995.

FOTSIS, T. et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Canc Research**, v. 57(14), p. 2916-21, 1997.

GABISON, E.E. et al. Metalloproteinases and angiogenesis. **Pat Biology**, v. 51(3), p. 161-66, 2003.

GAGLIARDI, A.R. et al. Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues. **Canc Chem Pharmacology**, v. 41(2), p. 117-24, 1998.

GARCIA, X. et al. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. **Gen Pharmacology**, v. 29(3), p. 457-62, 1997.

GARCÍA, M.D. et al. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J Ethnopharmacology**, v. 71(3), p. 395-400, 2000.

GIBBONS, L. Angiogenesis: Emerging Roles for the TGF β Superfamily. **Pathways**, v. 11, p. 14-16, 2010.

GLADE BENDER, J. et al. Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. **Drug Resist Update**, v. 7, p. 289-300, 2004.

HAFFTER, P. et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Development**, v. 123, p. 1-36, 1996.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J Morphology**, v. 88(1), p. 49-92, 1951.

HASAN, J. et al. Quantitative Angiogenesis assays in vivo – review. **Angiogenesis**, v. 7, p. 1-16, 2004.

HEIL, M. et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. **J Cell Molec Medicine**, v. 10, p. 45-55, 2006.

HEISS, M. et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. **Faseb Journal**, fj.14-267633, 2015.

HELLSTROM, M. et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. **J Cell Biology**, v. 153, p. 543-53, 2001.

HERBERT, S.P.; STAINIER, D.Y.R., Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biology**, v. 12, p. 551-64, 2012.

HYDER, S.M.; STANCEL, G.M. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. **Molecular Endocrinology**, v. 13(6), p. 806-11, 1999.

HOELZLE, M.K.; SVITKINA, T. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. **Mol Bio of the Cell**, v. 23, p. 310-23, 2012.

[Http://ibidi.com/xtpproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Slide-Angiogenesis](http://ibidi.com/xtpproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Slide-Angiogenesis). Acesso em: 30 de março de 2015.

<http://microgen.ouhsc.edu/biacore.htm>. Acessado em: 30 de março de 2015.

HOFF, P.M. et al. A Phase I Study of Escalating Doses of the Tyrosine Kinase Inhibitor Semaxanib (SU5416) in Combination with Irinotecan

in Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. **Jap J Clinical Oncology**, v. 36(2), p.100-03, 2006.

ISOGAI, S.; HORIGUCHI, M.; WEINSTEIN, B.M. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. **Dev Biology**, v. 230, p. 278-01, 2001.

ITOH, N.; Ornitz, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genetics**, v. 20(11), p. 563-69, 2004.

IZUTA, H. et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **Evid Based Complement Alternat Medicine**, v. 9, p. 1-10, 2009.

JAYARAMAN, S. Novel methods of type 1 diabetes treatment. **Discov Medicine**, v. 17(96), p. 347-55, 2014.

JEON, H. et al. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. **Mol Pharmacol**, v. 71, p. 1676-84, 2007.

KALKA, C. et al. Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization. **J Clin Investigation**, v. 25(6), p. 611-22, 2000.

KARLSSON, J.; VON HOFSTEN, J.; OLSSON, P.E. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. **Mar Biotechnology**, v. 3(6), p. 522-7, 2001.

KEZARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pac J Trop Biomedicine**, v. 3(4), p. 253-66, 2013.

KHALIL, N.M., PEPATO, M.T., BRUNETTI, I.L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from

antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Research**, v. 41(2), p. 165-71, 2008.

KIM, Y.K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149-56, 2002.

KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, v. 203, p. 253–310, 1995.

KLEINMAN, H.K. et al. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v.25, p. 312-18, 1986.

KLEINER, D.E.; STETLER-STEVENSON, W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal Biochemistry**, v. 218, p. 325-29,1994.

KOCH, A.E. Angiogenesis - Implications for rheumatoid arthritis. **Art Rheumatism**, v. 41(6), p. 951-62, 1998.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrofil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunology**, v. 13, p. 159-75, 2013.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84(5), p. 1415-20, 1994.

KORFF, T., AUGUSTIN, H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. **J Cell Biology**, v. 143, p. 1341-52, 1998.

KUWANO, M. Angiogenesis Factors. **Int Medicine**, v. 40, p. 565-72, 2001.

LAMATICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J.H. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. **Circul Research**, v. 100, p. 782-94, 2007.

LAWSON, N.D.; WOLFE, S.A. Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish. **Dev Cell**, v. 21(1), p. 48-64, 2000.

LIECKENS, S.; CLERCQ, R.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacology**, v. 61, p. 253-70, 2001.

LIZAMA, R.S.; MARTINEZ, M.M.; PÉREZ, O.C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco-ubí). **Rev Cub Farmácia**, v. 34(2), p. 5, 2000.

LOMBARDI, J.A. Systematics of Vitaceae in south America. **Canadian J Bot Rev Canad Botanique**, v. 85(8), p. 712-21, 2007.

LOMBARDI, J.A. Typification of Names of South-American *Cissus* (Vitaceae). **Taxonomy**, v. 44(2), p. 193-206, 1995.

LUCENA, F.R.S. et al. Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. **Braz J Pharmacognosy**, v. 1, p. 134-45, 2009.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím Nova**, v. 23, p. 429-38, 2002.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutrition**, v. 79, p. 727-47, 2004.

MAURO, A.; BUSCEMI, M.; GERBINO, A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproeinases in full-term human umbilical cord and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **J. Mol. Histology**, v. 41, p. 367-77, 2010.

MAHARAJ, A.S.; D'AMORE, P.A. Roles for VEGF in the adult. **Microvas Research**, v. 74, p. 100-13, 2007.

McCORMICK, J.F. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. **Scan Electron Microscopy**, v. 4, p. 2023-30, 1984.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. **Microvasc Research**, v. 88, p. 1–11, 2013.

MIGNATTI, P., RIFKIN, D.B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. **Physiol Review**, v. 73(1), p. 161-95, 1993.

MONTERO-BALAGUER, M. Stable Vascular Connections and Remodeling Require Full Expression of VE-Cadherin in Zebrafish Embryos. **PLoS ONE**, v. 4(6), e5772, 2009.

MOORE, K.L.; DALLEY, A.F. Anatomia Orientada para a Clínica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 5^a ed., 2007.

MOORE, K.L.; PERSUAD, T.V.N. The Developing Human: clinically oriented embryology. Saunders: **Philadelphia**, 8^a ed., 2008.

MOSCATELLI, D. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. **J Cell Physiology**, v. 131, p. 123-30, 1987.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65(1), p. 55-63, 1983.

MOTER, A., GOBEL, U.B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **J Microb Methods**, v. 41, p. 85-112, 2000.

MOURA, S.A.L. et al. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. **Evid Based Compl Alternat Medicine**, v.9, p.1-7, 2009.

MUNDEL, T.M.; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. **Microvasc Research**, v. 74, p. 85-89, 2007.

NAGY, J.A.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. **Annu Rev Pathology**, v. 2, p. 251-75, 2007.

NEUFELD, A. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **Faseb Journal**, v. 13(1), p. 9-22, 1999.

NICOLI, S., PRESTA, M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. **Nat Protocols**, v. 2, p. 2918-23, 2007.

NUGENT, M.A.; IOZZO, R.V. Fibroblast grow factor-2. **Int J Biochem Cell Biology**, v. 32, p. 115-20, 2000.

PANDYA, N.M.; DHALLA, N. S.; SANTATNI, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vasc Pharmacology**, v. 1, p. 30, 2006.

PHILLIPS, G.D.; WHITEHEAD, R.A.; KNIGHTON, D.R. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. **Am J Anatomy**, v. 192, p. 257-62, 1991.

PHNG, L.K.; GERHARDT, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch. **Dev Cell**, v. 16, p. 196-08, 2009.

PLOEG, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. **Eur J Histochemistry**, v. 44, p. 7-42, 2000.

PLUNKETT, M.L.; HAILEY, J.A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Lab Investigation**, v. 62(4), p. 510-70, 1990.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 16, p. 873-87, 2011.

PRESTA M. et al. Purine analogue 6-methylmercaptapurine riboside inhibits early and late phases of the angiogenic process. **Cancer Research**, v. 59, p. 2417-24, 1999.

- PRESTA, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 16(2), p. 159-78, 2005.
- PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? **J Applied Physiology**, v. 97, p. 1119-28, 2004.
- QUÍLEZ, A.M. et al. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **J Pharm Pharmacology**, v. 56(9), p.1185-89, 2004.
- RAZAKANDRAINIBE, R. et al. Crossing the wall: the opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. **Int J Biochem Cell Biology**, v. 1, p. 68-82, 2013.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmac Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.
- REN, W. et al. Flavonoids: promising anticâncer agents. **Med Res Review**, v. 23(4), p. 519-34, 2003.
- RIBATTI D.; VACCA A. Models for studying angiogenesis in vivo. **Int J Biol Markers**, v. 14, p. 207–213, 1999.
- RIBATTI D.; VACCA A.; RONCALI L.; DAMMACCO F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **Int J Dev Biology**, v. 40, p. 1189-97, 1996.
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, D. Sprouting angiogenesis, a reappraisal. **Dev Biology**, v. 15(2), p. 157-65, 2012.
- RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Rev Cell Dev Biology**, v. 11, p. 73-91, 1995.
- RODRIGUES, H.G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Rev Bras Plan Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 359-66, 2011.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUKI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v. 8(64), p. 867-69, 1991.

RUSNATI, M. et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood**, v. 104(1), p. 92-9, 2004.

RUSSIN, J.J.; GIANNOTTA, S.L. The putative role of pericytes in tumor angiogenesis. **World Neurosurgery**, v. 76(6), p. 535-36, 2011.

SADLER, T.W.; LANGMAN, J. Langman's medical embryology. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, 12^a ed, 2012. NLM ID: 101224974 [Book].

SÁENZ, M.T et al. Cytotoxic Activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Phyt Research**, v. 14, p. 552-54, 2000.

SAGAR, S.M.; YANCE, D.; WONG, R.K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer – Part 1. **Cur Oncology**, v. 13, p. 14-26, 2006.

SALGADO, J.M.; MANSI, D.N.; GAGLIARDI, A. *Cissus sicyoides*: analysis of glycemic control in diabetic rats through biomarkers. **J Med Food**, v. 12(4), p. 722-27, 2009.

SANTOS, H.B. et al. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos de fase II, **Rev Bras Farmacognosia**, v. 18(1), p. 70-76, 2008.

SEMENZA, G.L. Vasculogenesis, Angiogenesis and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. **J Cell Biochem**, v. 102, p. 840-47, 2007.

SIEMENRINK, M.J. et al. Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. **J Histochem Cytochemistry**, v. 61, p. 101-15, 2012.

SILVA, G.A. et al. Estudo toxicológico e farmacológico dos extratos fluidos de *Cissus sicyoides* L. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 1, p. 143-55, 1993.

SILVA, G.A. et al. Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 1, p. 96-112, 1996.

SILVA, L. et al. Bicyclgermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Bra J Pharmacognosy**, v. 17(3), p. 361-67, 2007.

SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. Histology. In: WEISS, L. & GREEP, R. O. The cardiovascular system. New York, **McGraw-Hill**, p. 418, 1977.

SOUZA V. C.; LORENZI H. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum: **Nova Odessa**, 2005.

STATON C.A. et al. Alphastatin, a 24 amino-acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. **Blood**, v. 103, p. 601-06, 2004.

SURI, C. et al. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, v. 87, p. 1171-80, 1996.

SWINGER R.R.; TUCKER J.D. Fluorescence in situ hybridization: a brief review. **Env Mol Mutagenesis**, v. 27, p. 245-54, 1996.

THISSE, C.; THISSE, B. Hight-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. **Nat protocols**, v.3, p 59-69, 2008.

TIRZIU, D.; SIMONS, M. Angiogenesis in the human heart: Gene and cell therapy. **Angiogenesis**, v. 8, p. 241-51, 2005.

TOBIA, C.; DE SENA, G.; PRESTA, M. Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis. **Int J Dev Biology**, v. 55 (4-5), p. 505-9, 2011.

TOBIA, C. et al. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. **Bioch. Bioph Acta**, 2013.

TORTORA, G. Princípios de Anatomia Humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 10^a ed., 2007.

UDENIGWE, C.C. et al. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutr Reviews**, v. 66(8), p. 445-54, 2008.

VASCONCELOS, T.H.C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev Bras Farmacognosia**, v. 17(4), p. 583-91, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura Segura? **Quim Nova**, v. 28(3), p. 519-28, 2005.

VIANA, G.S. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacol**, v. 4, p. 9, 2004.

VICENTINI, V.E.P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23(2), p. 6, 2001.

VISWANATHA, S. et al. Some Neuropharmacological Effects of the Methanolic Root Extract of *Cissus quadrangularis* in Mice. **Afr J Biom Research**, v. 9, p. 69-75, 2006.

WACKER, A.; GERHARDT, H. Endothelial development taking shape. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, p. 676-85, 2011.

WANG, R. et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. **Nature**, v. 468, n. 7325, p. 829, 2010.

WANG, S. et al. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2467-78, 2004.

WELSH, L.C.; WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **J Inter Medicine**, v. 273, p. 114-27, 2013.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. Oregon: **University of Oregon Press**, 4^a ed., 2000.

WOISKY, R.G; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **J Apicult Research**, v. 37 (2), p. 99-105, 1998.

XU, F. et al. Structures of new flavonoids and benzofuran-type stilbene and degranulation inhibitors of rat basophilic leukemia cells from the Brazilian herbal medicine *Cissus sicyoides*. **Chem Pharm Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1089-95, 2009.

XU, K.; CLEAVER, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. **Semin Cell Dev Biology**, v. 22, p. 993-04, 2011.

YI, J.M.; BANG, O.S.; KIM, N.S. An evaluation of the anti-angiogenic effect of the Korean medicinal formula "Sa-mi-yeon-geon-tang" in vitro and in ovo. **BMC Comp Altern Medicine**, v. 5, p. 15-42, 2015.

YANCOPOULOS, G.D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, p. 242-48, 2000.

YAYON, A et al. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**, v. 22, p. 369-75, 1991.

ZAHRA, M.; WEI, Y.; DAVID, A.R. Combined effects of physiologically relevant disturbed wall shear stress and glycated albumin on endothelial cell functions associated with inflammation, thrombosis and cytoskeletal dynamics. **J Diab Investigation**, v. 5, p. 372-81, 2014.

ZHAO, D. et al. Inibitory effects of quercetina on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. **Eur J Pharmacology**, v. 723, p. 360-67, 2014.

Anexos

Anexo 1. Aprovação dos Protocolos de Pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00826
Título
METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE ESTUDOS EM BIOTIVIDADE E MORFOGÊNESE ANIMAL - LEBMA
Data de Entrada
13/05/2013

Resultado:
Aprovado
Data/Prazo
05/07/2013

Considerações
Ofício nº 54/CEUA/PROPEQ/2013
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(ã): Prof(a) Dr(a) Paulo Fernando Dias, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),
Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no protocolo e parecer estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: trezentos Gallus domesticus e setecentos e vinte camundongos (Mus musculus).


Procedência do animal: Indústria Avícola Tyson® do Brasil e Laboratório Setorial BIO054.
Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 08/10/2017

Data 08/07/2013

Parecer(es):




Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

Anexo 2. Autorização para acesso e coleta de *C. verticillata* L. (CGEN).

*para a Prof.ª para
atender com a todos os requisitos*

2010/13



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
 Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas
 Coordenação Geral de Autorização de Uso da Flora e Florestas
 SCEN Trecho 2 Ed. Sede do Ibama - Cx. Postal nº 09566 Brasília - DF
 CEP: 70818-900 e Telefone: 61) 3316-1474
 www.ibama.gov.br

Registrado no SGD/GR/UFSC
 Em 30/05/2013
Rita

OP 02001.007330/2013-74 CGAUF/IBAMA

Brasília, 13 de maio de 2013.

À Sua Magnificência o(a) Senhor(a)
 Roselane Neckel
 Reitor(a) da Universidade do(a) UFSC - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 FLORIANOPOLIS - SANTA CATARINA
 CEP.: 88.040-900

Assunto: **Inclusão de projeto na Autorização Especial de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético.**

Magnífico(a) Reitor(a),

1. Cumprimentando Vossa Senhoria vimos informar a inclusão do seguinte projeto de pesquisa, no portfólio da Autorização Especial da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, para Acesso e Remessa de Componente do Patrimônio Genético:

. Avaliação dos extratos aquoso e hidroalcolico de folhas de *Cissus verticillata* L. em processo de anguigênese fisiopatológica, coordenado pelo Dr. Paulo Fernando Dias - Processo/Ibama nº 02001.001806/2013-63. ;


Atenciosamente,

Julianna Sampaio
JULIANNA SAMPAIO GOMES DE OLIVEIRA
 Coordenador(a)-Geral do(a) CGAUF/IBAMA

GABINETE DO REITOR/UFSC
 RECEBIDO EM
 30/05/13. Às 14:46
Rita
 NOME

IBAMA pag. 1/1 13/05/2013 - 09:05

Anexo 3. Declaração de depósito de subamostra de *C. verticillata* L.
(Herbário RB)



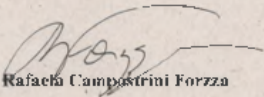
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO

DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins, que o Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro recebeu para depósito subamostra de *Cissus verticillata*. O número de processo no CGEN não foi informado no momento do depósito. Conforme nosso acordo o JBRJ fará a guarda desta exsicata.

RB 563.065.

Rio de Janeiro, 29 de janeiro de 2013.



Rafaela Camostrini Forzza
Curadora do Herbário RB

2

Setembro 2013