

**FÁBIO D'AGUIAR MATAVELI**

**Efeitos da Expressão de VEGF<sub>165</sub> Humano Injetado no Músculo  
Cardíaco de Ratos, Após Indução de Infarto Agudo do Miocárdio, na  
Fase Tardia de Remodelamento da Matriz Extracelular.**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências Médicas.

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FÁBIO D'AGUIAR MATAVELI**

**Efeitos da Expressão de VEGF<sub>165</sub> Humano Injetado no Músculo  
Cardíaco de Ratos, Após Indução de Infarto Agudo do Miocárdio, na  
Fase Tardia de Remodelamento da Matriz Extracelular.**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências Médicas.

São Paulo

2008

Mataveli, Fábio D'Aguiar

Efeitos da Expressão de VEGF<sub>165</sub> Humano Injetado no Músculo Cardíaco de Ratos, Após Indução de Infarto Agudo do Miocárdio, na Fase Tardia de Remodelamento da Matriz Extracelular.– São Paulo, 2008.

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.**

**1. Matriz Extracelular 2. Infarto do Miocárdio 3. VEGF 4. Terapia Gênica 5. Glicosaminoglicanos**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Co-orientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos Lopes  
Prof. Dr. San Wan Han

**Agradeço a Deus que, em seus desígnios,  
me fez nascer num meio em que pudesse desenvolver a inteligência.**

**Ao meu pai, por me ensinar o valor do  
estudo, da família e da integridade através do seu exemplo.**

**À minha mãe, por sempre cuidar das  
pessoas quando mais precisam, por estar sempre bem humorada nas situações  
mais fáceis e mais difíceis, por valorizar o mais simples.**

**Ao meu irmão, por se preocupar tanto  
com a família, pelo seu bom humor e sua amizade.**

**Aos meus avós, por terem iniciado a  
família num alicerce de amor, trabalho e fé.**

**Agradeço ao Dr. Antônio Carlos Lopes, por se dedicar tanto às pessoas ao seu redor, seus amigos, seus pacientes e seus alunos, de uma forma que está, muitas das vezes, além de nossa capacidade de percepção e retribuição.**

**Agradeço a Dra. Maria Aparecida Pinhal, por ter me recebido de braços abertos, por acreditar na minha capacidade, por ter tido paciência e ter suportado as mais difíceis provas ao meu lado, e por termos ido até o final desse trabalho juntos.**

**Agradeço o Dr. Sang Wan Han, pela sua amizade, sua orientação na vida pessoal e acadêmica, por acreditar e apostar tanto em mim, principalmente quando não conseguia enxergar muito além dos problemas do presente.**

**Agradeço à Dra. Helena Nader, que dedicou sua vida à UNIFESP e seus alunos, que me elogia muito além do que eu mereço, e que me corrige com tanta propriedade e amor.**

**Agradeço ao Dr. José Baptista, pelo seu apoio irrestrito quando mais precisei, por sua amizade, por sua sede de conhecimento, por seu respeito aos pacientes, pelo seu exemplo.**

**Agradeço à Dra. Maria Helena Stangler Kraemer, por sua amizade, sua orientação na vida acadêmica e pessoal, por ter me colocado na linha de frente, confiando, suportando e apostando em mim desde minha graduação.**

**Agradeço ao Dr. Cássio Raposo do Amaral (*in memoriam*), por ter sido um visionário do meio acadêmico e clínico, por ter confiado tantas responsabilidades a alguém tão novo e inexperiente como eu, por ter me falado concretamente sobre terapia gênica quando eu apenas imaginava essa possibilidade num futuro distante.**

**Agradeço a todos os meus amigos e colegas da Clínica Médica, da Biologia Molecular, da Cirurgia Cardiovascular, do Centro Multidisciplinar de Terapia Gênica, da Patologia, da Fundação ABC e do Laboratório e Fisiologia Cardíaca da UNIFESP que foram, em diferentes graus, co-responsáveis pelos resultados obtidos nesse trabalho.**

## ÍNDICE

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 O Desafio da Angiogênese.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 A Descoberta de Fatores que Induzem a Angiogênese.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEFG).....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 O Uso do Gene do VEGF<sub>165</sub> Como Indutor de Angiogênese Pós Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 O Papel da Matriz Extracelular.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Elementos da Matriz Extracelular e Sua Interação com Fatores de Crescimento.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6.1 Heparan Sulfato.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6.2 Condroitim Sulfato.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6.3 Dermatan Sulfato.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6.4 Ácido Hialurônico.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6.5 Proteoglicanos de Heparan sulfato (HSPG), Sindecam-4.....</b>	<b>25</b>
<b>1.6.6 Heparanase.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.7 Catepsina B.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Resultados publicados.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.1 Efeitos a longo prazo da transferência do gene do VEGF<sub>165</sub> na fase aguda do infarto do miocárdio no remodelamento da matriz extracelular miocárdica (ANEXO I).....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2 Síntese e produção de glicosaminoglicanos induzidas por fatores de crescimento são composto e célula-específicas (ANEXO II).....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Resultados Não Publicados .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>43</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## **Índice de Figuras e Tabelas**

Figura 1. Esquema do plasmídeo pcDNA3.1.....	18
Figura 2. Esquema da membrana celular e interações com a matriz extracelular e componentes do citoesqueleto .....	20
Figura 3. Esquema das Unidades Estruturais dos Glicosaminoglicanos .....	21
Figura 4. Esquema da Estrutura de ligação dos glicosaminoglicanos .....	22
Tabela 1. Relação de Fração de ejeção de quantidade de GAG nos diferentes grupos...	36

## RESUMO

O remodelamento cardíaco é em última instância regulado por componentes da matriz extracelular (MEC). Investigamos o importante papel que os fatores de crescimento desempenham na regulação do remodelamento da MEC cardíaca decorrente do infarto agudo do miocárdio. Ratos foram submetidos à ligação da artéria coronária descendente esquerda e subsequente transferência gênica intramiocárdica do plasmídeo pVEGF<sub>165</sub> no grupo tratado. Os animais foram divididos de acordo com o tamanho do infarto em grande (LMI), pequeno (SMI), com ou sem tratamento com a transferência gênica. O plasmídeo contendo o cDNA que codifica para o VEGF<sub>165</sub> foi injetado no músculo cardíaco e seus efeitos sobre os componentes da MEC foram analisados. Os ensaios de transfeção foram realizados com células endoteliais e musculares lisas, utilizando pcDNA3.1 recombinante contendo cDNA do VEGF<sub>165</sub>. Os glicosaminoglicanos foram identificados e quantificados por eletroforese em gel de agarose e ELISA como também por imunohistoquímica para investigar alterações da expressão da catepsina B, heparanase e sindecam-4. A quantidade de ácido hialurônico (HA) ( $p < 0.005$ ), dermatam sulfato (DS), condroitim sulfato (CS) e heparan sulfato (HS) ( $p < 0.001$ ) foram significativamente maiores no grupo LMI tratado em comparação com os demais grupos, corroborando com a diminuição na expressão da heparanase. Uma diminuição da massa molecular do HA foi observada no tecido cicatricial do grupo tratado. Os dados obtidos fortemente sugerem que alterações da MEC e de seus componentes são importantes determinantes do remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio, podendo ser essenciais na resposta inflamatória e na tentativa de recuperar os danos e prover mecanismos compensatórios para manter a fração de ejeção cardíaca, visto que os componentes da MEC analisados estão diretamente envolvidos na angiogênese, proliferação e diferenciação celular. Os ensaios *in vitro* mostraram que a resposta aos fatores de crescimento com relação à síntese dos glicosaminoglicanos é dependente do tipo celular e dose utilizada.

## ABSTRACT

Cardiac remodeling is ultimately regulated by components of the extracellular matrix (ECM). We investigated the important role that growth factors play in the regulation of ECM remodelling that occurs as a consequence of myocardium damage. Rats were submitted to the ligation of the left anterior coronary artery and pVEGF<sub>165</sub> was immediately injected intramyocardially in the treated group. The animals were divided into large (LMI) and small infarct (SMI), with or without gene transfer. The plasmid containing cDNA encoding VEGF<sub>165</sub> was injected into the cardiac muscle and its effect was observed on the ECM components. Transfection assays were also performed with endothelial and smooth muscle cells using recombinant pcDNA3.1 containing VEGF<sub>165</sub> cDNA. Glycosaminoglycans were identified and quantified by agarose gel based electrophoresis and ELISA as well as immunocytochemistry to examine specific cathepsin B, heparanase and syndecan-4 changes. The amounts of hyaluronic acid (HA), (p<0.005), dermatan sulfate (DS), chondroitin sulfate (CS) and heparan sulfate (HS) (p<0.001) were significantly increased in the LMI treated group in comparison to the other groups, which correlates with the decrease in the expression of heparanase. A decrease in the molecular mass of HA was found in the scar tissue of treated group. The data obtained strong support the idea that changes in the ECM and its components are important determinants of cardiac remodelling after myocardium infarct and may be essential for inflammatory response and attempt to stabilize the damage and provide a compensatory mechanisms to maintain cardiac output since the ECM components analyzed are involved with angiogenesis, cell proliferation and differentiation. *In vitro* assays showed that growth factors affect glycosaminoglycans synthesis in a cell specific and dose dependent manner.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 O Desafio da Angiogênese**

O sistema de transporte de gases, nutrientes e metabólitos em um dado organismo, varia de acordo com o seu grau de complexidade. A difusão direta, por exemplo, é um sistema que nutre com eficácia organismos que apresentam estruturas pequenas e rudimentares. Entretanto, aumentando-se o nível de organização em tecidos e órgãos, encontramos um sistema circulatório capaz de uma regulação fina do transporte dos elementos necessários ao metabolismo celular em diferentes partes desse organismo, como também a capacidade de regeneração, ou compensação, de segmentos desse sistema que, por acaso, sejam lesados.

A lesão de segmentos do sistema circulatório impede o fluxo sanguíneo, gerando uma área isquêmica. Quando esse fluxo é impedido de modo súbito na artéria coronária esquerda, ocorre a isquemia aguda do músculo cardíaco, que deve ser rapidamente revertida para que não ocorra a perda de sua função.

A oclusão de um vaso principal pode ser compensada pela existência de uma circulação colateral eficiente. Mas, o coração de um adulto apresenta um pequeno número de vasos colaterais, na maioria das vezes insuficientes para suprir o metabolismo cardíaco.

Uma estratégia que tem sido estudada para minimizar os efeitos dessa oclusão é a indução da angiogênese no músculo cardíaco (Rosengart et al., 1999; Patterson et. al., 2000; Gonçalves et. al., 2001).

A angiogênese é o processo pelo qual um novo vaso sanguíneo se desenvolve à partir de uma vasculatura pré-existente (Conway et. al., 2001; Carmeliet, 2003). A

proliferação de células endoteliais é essencial para o desenvolvimento e diferenciação durante o processo de angiogênese. Mas, diferentemente dos elementos hematopoiéticos e do epitélio intestinal, de rápido turnover, as células endoteliais nos vasos sangüíneos maduros não se proliferam ou migram ativamente. Seu tempo de duplicação é medido em anos ou décadas (Hobson et.al., 2001), diferentemente do epitélio intestinal que pode ser medido em dias (Bloom et. al., 1975). Os capilares normalmente se proliferam apenas durante o desenvolvimento embrionário, na menstruação, na inflamação e no reparo tecidual. Novos vasos geralmente não crescem no adulto exceto nessas situações e em algumas patológicas, mas o sistema vascular responde quase instantaneamente a sinais angiogênicos apropriados (Cohen et. al., 1992).

## **1.2 A descoberta de fatores que induzem a angiogênese**

Durante muito tempo haviam apenas evidências de que esses sinais, fatores que estimulassem a angiogênese, existiam. Até que na década de 80, o desenvolvimento de cultura de células endoteliais de capilares e experimentos com cultura de células sensíveis, permitiram um progresso mais rápido na purificação desses fatores de angiogênese, surgindo a necessidade de determinar o papel fisiológico desses fatores nas condições normais e patológicas associadas com a angiogênese *in situ* .

Os fatores até então identificados foram assim classificados em duas classes distintas: os que apresentavam um efeito direto na migração e/ou proliferação das células endoteliais, e os que apresentavam um efeito indireto nesse processo. Dentre os fatores que apresentavam um efeito angiogênico direto nas células endoteliais, encontramos os fatores que se ligam à heparina.

O papel da heparina no processo de angiogênese foi primeiramente apontado por estudos que mostraram que a heparina estimulava a migração de células endoteliais de

capilares *in vitro*. Pouco depois, Taylor e Folkman (Taylor and Folkman, 1982) demonstraram que a heparina podia potencializar a atividade de fatores angiogênicos *in vitro* e, mais tarde, Thorton e colaboradores (Thorton et. al., 1983) demonstraram essas mesmas propriedades *in vivo*. Esses estudos apontaram uma possível interação entre a heparina e fatores de crescimentos angiogênicos. Nessa linha de pensamento científico, Shing e colaboradores (Shing et. al., 1984) testaram o uso da heparina como meio de purificar esse fatores angiogênicos, devido à sua grande afinidade pelos mesmos. O sucesso dessa abordagem levou a um rápido avanço no isolamento e caracterização de uma importante classe de fatores angiogênicos, os fatores que apresentam grande afinidade com a heparina (Cohen et. al., 1992). Incluíram-se nessa classe, o fator tumoral de angiogênese (TAF), o fator de crescimento de células endoteliais (EGF), os fatores de crescimento de fibrobalsto (FGFs), os fatores de crescimento derivados da retina (RDGF) e do olho (EDGF), e o fator de crescimento da cartilagem (CDGF).

Em 1983, Seinger e associados (Seinger et. al., 1983) descreveram a purificação de uma proteína capaz de induzir o extravasamento capilar na pele de cobaias. Essa proteína foi chamada de fator de permeabilidade vascular (VPF) e foi considerada um regulador específico da hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos tumorais.

Em 1989, Ferrara e Henzel (Ferrara et. al., 1989) publicaram a purificação e seqüenciamento de um mitógeno específico para a célula endotelial que foi chamado de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A subsequente clonagem de VEGF e VPF demonstrou que se tratava da mesma molécula.

A descoberta de que essa molécula, o VEGF, era potente e específica para as células endoteliais vasculares, levou à hipótese de que ela poderia desempenhar um papel chave na regulação do crescimento fisiológico e patológico dos vasos sanguíneos. Esse papel foi confirmado em estudos mais recentes e provaram que o VEGF é um

potente mitógeno para células endoteliais micro e macro vasculares de artérias, veias e vasos linfáticos (Jakerman et. al., 1993).

Já o efeito de extravasamento capilar causado pelo VEGF observado logo no início de sua descoberta, mostrou-se uma etapa importante no processo de angiogênese. O extravasamento de proteínas plasmáticas resulta na formação de fibrina. As células endoteliais aderem e migram à rede de fibrina e ao seu precursor, o fibrinogênio, por intermédio de receptores de superfície que interagem com domínios específicos de proteínas da matriz extracelular (Henk et. al., 1996).

### **1.3 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEFG)**

O gene do VEGF humano é organizado em oito exons separados por sete introns, e sua região codificadora se estende por aproximadamente 14 kilobases (kpb), sendo localizado no cromossomo 6p21.3 (6).

A análise dos clones do cDNA dos clones do VEGFA humano inicialmente indicou que poderiam existir quatro diferentes espécies moleculares, apresentando, respectivamente 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, o VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub> (Ferrara et. al., 1996; Leung et. al., 1989; Keck et. al., 1989). O processo de *splicing* alternativo de um único gene VEGF é a base desta heterogeneidade molecular. O VEGF<sub>165</sub> nativo é uma glicoproteína básica de alta afinidade por heparina, e atua na forma homodimérica de 45 kDa. Representa a isoforma secretada predominante de VEGF tanto em células normais quanto em células transformadas. O VEGF<sub>165</sub> contém resíduos de aminoácidos básicos que fazem a mediação de sua ligação com componentes da matrix extracelular ricos em resíduos de açúcares ácidos como heparan sulfato.

O VEGF<sub>165</sub> apresenta-se 50 à 100 vezes mais potente como um fator mitógeno em relação à outras isoformas (Ferrara et. al., 1999).

Vários mecanismos parecem estar associados na regulação da expressão do gene do VEGF. Dentre esses, a tensão do oxigênio desempenha um papel singular. A expressão do mRNA do VEGF é induzida pela baixa pressão parcial de oxigênio em uma grande variedade de cultura de células normais ou transformadas. Uma seqüência de 28 bases foi identificada no promotor do gene VEGF que faz a mediação da expressão induzida por hipóxia. Tal seqüência revela um alto grau de homologia e tem características de ligação à proteína semelhantes ao sítio de ligação do fator 1 de hipóxia induzida (HIF-1), localizado dentro do gene de eritropoetina (Ferrara et. al., 1996).

O HIF-1 foi purificado e clonado como um mediador de transcrição em resposta à hipóxia (Ferrara, 1996).

Quando ocorre a oclusão total ou parcial de uma artéria coronariana, a hipóxia se torna um dos principais fatores que regulam as mudanças contrátil e metabólica do coração na fase de isquemia aguda. O HIF-1 é então expresso em resposta a diminuição da pressão parcial de oxigênio no tecido cardíaco, ativando genes envolvidos na angiogênese, glicólise, modulação do tônus vascular e eritropoiese. A elevação dos níveis de HIF- $\alpha$  mRNA no tecido cardíaco isquêmico ou infartado é a primeira resposta molecular de adaptação do miocárdio à interrupção do aporte sanguíneo pela artéria coronária (Lee et. al., 2000).

#### **1.4 O uso do gene do VEGF<sub>165</sub> como indutor de angiogênese pós infarto agudo do miocárdio (IAM).**

A circulação colateral coronariana pode melhorar o prognóstico em doenças isquêmicas cardíacas, como o infarto do miocárdio (IAM), a angina e a morte súbita. A

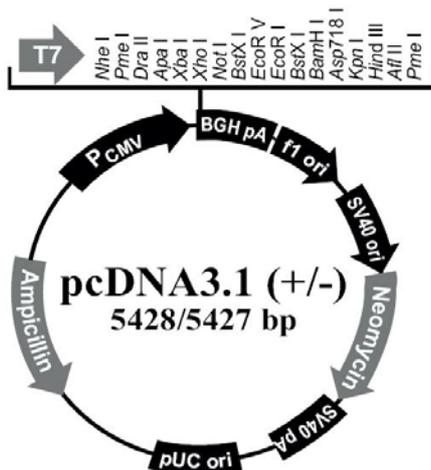
viabilidade do miocárdio depois do infarto agudo, correlaciona-se com a extensão do fluxo sanguíneo colateral do seguimento vascular afetado. A expansão de colaterais pré-existentes envolve a adição de novos componentes vasculares (endotélio, músculo liso e fibroblastos) via mitose, migração, remodelamento, degradação da matriz extracelular e diferenciação (Matsunaga et. al., 2000).

Porém, no coração de um adulto, os genes que codificam os fatores indutores de angiogênese e seus receptores são expressos em níveis aparentemente insuficientes na maioria dos indivíduos para induzir a formação de colaterais competentes em resposta a uma isquemia crônica (Rosengart et. al., 1999).

Uma nova estratégia que está sendo estudada para o tratamento da isquemia do miocárdio é a indução da neovascularização do coração por ativação de genes que induzam a formação de vasos sanguíneos. Os genes como VEGF e FGF são os mais usados para esta proposta atualmente.

Uma das maneiras de administrar esse gene para o paciente portador de uma doença isquêmica é por meio de injeção de um plasmídeo que codifica o VEGF diretamente no miocárdio. As células que captam o plasmídeo passam a expressar esse gene e a produzir o VEGF, desencadeando o processo de angiogênese.

Os plasmídeos, que são DNA circulares obtidos da bactéria, são relativamente atóxicos quando usados para a terapia gênica (Figura 1). Apesar de serem transfectados ineficientemente pela maioria das células, apresentando apenas uma expressão transitória, nas células do músculo estriado, incluindo o músculo cardíaco, os DNAs são facilmente incorporados e sua expressão pode ser medida em semanas (Patterson et. al., 2000; Gonçalves et. al., 2001).



**Figura 1. Esquema do plasmídeo pcDNA3.1 (Clontech).** O gene do VEGF<sub>165</sub> foi clonado entre os sítios das enzimas *Bam H I* e *Hind III*.

Além disso, os efeitos do VEGF secretado de uma célula pode ser transmitido para as células adjacentes, mesmo que essas não tenham incorporado o plasmídeo, pois pequenas variações na concentração local de VEGF podem causar efeitos significativos na sua atividade biológica .

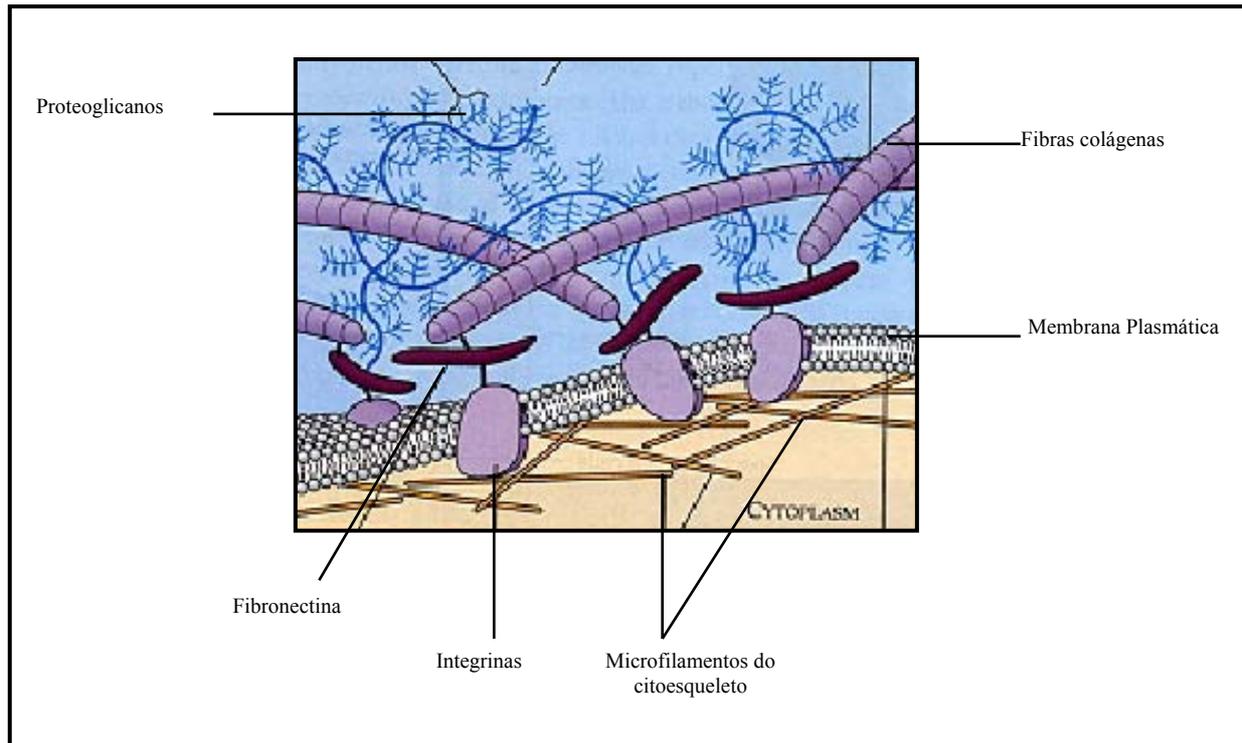
### 1.5 O papel da Matriz Extracelular

Componentes da matriz extracelular agem em conjunto com os fatores de crescimento FGF e VEGF e seus respectivos receptores controlando vários aspectos da formação de vasos, tanto no desenvolvimento normal como em situações patológicas.

Esses fatores interagem com a matriz extracelular e com outros fatores de crescimento por intermédio das cadeias sulfatadas de glicosaminoglicanos, do esqueleto protéico dos proteoglicanos ou ambos, conectando a superfície celular com citoesqueleto e o meio extracelular (Figura 2). Existem evidências de que a variação de resposta angiogênica pós infarto agudo do miocárdio seja devido, em parte, à variada expressão dessas moléculas na matriz extracelular cardíaca (Mizutani et. al., 2001; Yamauchi et. al., 2000). Tais evidências podem ser baseadas na importância da matriz extracelular durante o remodelamento cardíaco. Um estudo experimental em ratos para

identificar os principais genes envolvidos no remodelamento cardíaco demonstrou que 80% dos genes superexpressos e 80% dos genes induzidos, uma semana após a ocorrência de um infarto do miocárdio podem estar relacionados à componentes da matriz extracelular (Kizaki et. al., 2005). Outro experimento, utilizando porcos como modelo experimental, demonstrou que a maior parte da matriz extracelular permanece intacta após indução do IAM, colocando-a como um dos principais organizadores da regeneração tecidual local (Yamauchi et. al., 2000).

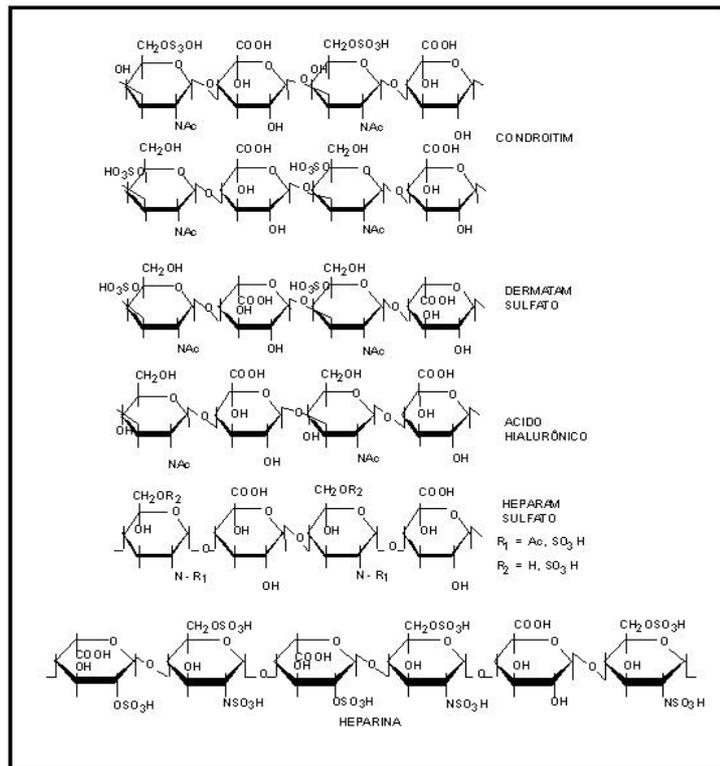
A matriz extracelular é uma rede complexa de colágenos, glicoproteínas fibrilares e proteoglicanos que determina não apenas a arquitetura específica do tecido, mas também as condições nas quais atividades biológicas ocorrem. Os componentes da matriz extracelular provêm uma grande variedade de sinais que influenciam diretamente a migração, proliferação, diferenciação, morfologia e atividades de síntese da célula (Mizutani et. al., 2001). Adicionalmente, a matriz extracelular desempenha um papel essencial na sobrevivência da célula uma vez que a perda de contato da célula com a matriz leva à sua apoptose ou, nesse caso específico, *anoikis* (Mizutani et. al., 2001).



**Figura 2. Esquema da membrana celular e interações com a matriz extracelular e componentes do citoesqueleto.**

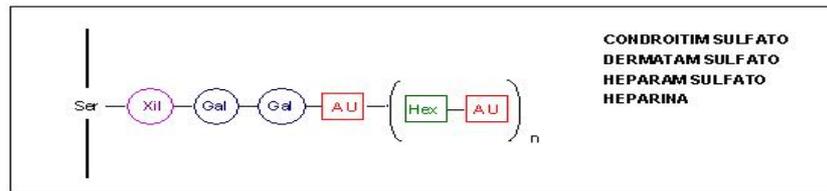
Glicosaminoglicanos (GAG) são um dos principais componentes macromoleculares da matriz extracelular. Com exceção do ácido hialurônico, que é um grande polímero de cadeia linear, todos os outros GAG possuem grupos N- ou O sulfatados ligados à sua cadeia de dissacarídeos. Ou seja, são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas, compostas por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas (Figura 3). Estes polímeros possuem uma alta densidade de cargas negativas conferidas pela presença de grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos e/ou grupamentos sulfatos (Brimacombe et. al., 1964). A alta densidade de cargas negativas atrai cátions como o  $\text{Na}^+$ , por exemplo que são osmoticamente ativos,

resultando assim na incorporação de água na matriz extracelular. Isto gera uma pressão que faz com que a matriz extracelular resista às forças compressoras, em contraste com as fibrilas de colágeno que resistem à força tensora, sendo essa uma das funções dos GAG (Shriver e Sasisekharan, 2002).



**Figura 3. Esquema das Unidades Estruturais dos Glicosaminoglicanos.**

Com exceção do ácido hialurônico, as cadeias dos demais glicosaminoglicanos sulfatados são covalentemente ligadas a um esqueleto protéico formando proteoglicanos (PG). Nos proteoglicanos, as cadeias de GAG estão unidas pelo terminal redutor a um tetrassacarídeo, ácido D-glucurônico- D-galactose- D-galactose- D-xilose, estando a xilose ligada por uma ligação do tipo O-glicosídica ao grupamento hidroxila de um resíduo de serina da proteína (Figura 4). Os proteoglicanos estão estrategicamente localizados na superfície celular e matriz extracelular.



**Figura 4. Esquema da Estrutura de ligação dos glicosaminoglicanos.** Ligação dos glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto protéico. Gal: galactose; Xil: xilose; AU: ácido urônico; Hex: hexosamina; Ser: serina.

Além de sua função estrutural, os GAG e PG desempenham diferentes funções em diversos processos como regulação enzimática e adesão, crescimento, diferenciação e migração celular. Esses processos são mediados pela sua capacidade de ligação e imobilização de um diverso número de proteínas biologicamente ativas. Dentre estas moléculas, os fatores de crescimento são responsáveis e se apresentam como grandes moduladores da resposta tecidual à isquemia (Yamauchi et. al., 2000).

## 1.6 Elementos da Matriz extracelular e sua interação com fatores de crescimento.

### 1.6.1 Heparan Sulfato

O heparan sulfato é o glicosaminoglicano mais freqüente na superfície das células (Langford et. al., 1998).

Os mecanismos de sinalização intracelular ativados por FGFs e VEGFs são essencialmente dependentes do heparan sulfato. Células deficientes na síntese de heparan sulfato não são capazes de ativar a cascata de sinalização desencadeada por esses fatores de crescimento. Quando em cultura de células deficientes na produção de heparan sulfato, a adição de heparina ou heparan sulfato exógenos restabelece temporariamente a capacidade de ativação dessa cascata de sinalização induzida pelo FGF e VEGF (Iozzo et. al., 2001).

O HS seqüestra, estabiliza e protege FGF e VEGF da inativação. Além disso, funciona como co-receptor de baixa afinidade que promove a formação de complexos HS - Fator de crescimento - Receptor, que facilitam a dimerização do receptor e a propagação da sinalização intracelular (Gallagher et. al., 2001; Gambarini et al)

### **1.6.2 Condroitim Sulfato**

As unidades fundamentais dos condroitim sulfatos consistem do ácido *D*-glucurônico, unido por uma ligação  $\beta$  (1-3) à N-acetil-galactosamina-O-sulfatada. A sulfatação pode ocorrer nas posições 4 e/ou 6 da N-acetil-galactosamina. A ligação interdissacarídica é do tipo  $\beta$  (1-4). As estruturas destes compostos são híbridas, pois o condroitim 6-sulfato pode apresentar uma certa porcentagem de sulfatação na posição C-4 e vice-versa (Michelacci e Dietrich, 1976; Michelacci e Dietrich, 1986).

O condroitim 6-sulfato está relacionado com a integridade dos tecidos sujeitos à forças mecânicas (Michelacci et. al., 1979; Horton et. al., 1989), enquanto que o condroitim 4-sulfato parece estar envolvido nos processos de crescimento e ossificação (Michelacci et. al., 1979).

O principal proteoglicano de CS produzido pelas células musculares lisas é o versicam. O versicam interage com o ácido hialurônico (AH), formando um complexo molecular que desestabiliza a ancoragem celular à MEC, facilitando a migração celular. A expressão preferencial de CS foi observada em cultura de células musculares lisas de vasos calibrosos que, quando sofrem injúria, alternam rapidamente a síntese de seus proteoglicanos de HS para CS assim que a migração celular é iniciada, relacionando a expressão de CS à motilidade celular, que é uma das etapas primordiais da angiônese (Henk et. al., 1996).

### **1.6.3 Dermatam Sulfato**

O dermatam sulfato, anteriormente referido como condroitim sulfato B, difere do condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato, pela presença do IdoUA em sua estrutura (Fransson et. al., 1968; Michelacci et. al., 1974; Población et. al., 1986).

O DS é liberado em altas concentrações durante a fase ativa de reparação tecidual, interagindo com fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, agindo como estabilizador, co-fator e co-receptor para esses fatores. O DS também está possivelmente associado ao “assembly” (montagem, conexão) dos componentes da MEC.

Sua função está possivelmente associada à organização, velocidade de deposição e manutenção das fibrilas de colágeno (Scott et. al., 1992). O DS ocorre em altas concentrações em tecidos fibrosos ricos em colágeno do Tipo I.

Por ser liberado em grandes concentrações durante o reparo do tecidual, o estudo do DS é um importante aspecto a ser avaliado no estudo de fatores de crescimento ativos nos processos de cicatrização (Penc et. al., 1998).

#### **1.6.4 Ácido Hialurônico**

O ácido hialurônico é parte integral da matriz extracelular (Chen et. al., 1999). Apresenta-se na sua forma nativa como um grande polímero linear formado por repetidos dissacarídeos de ácido glucurônico e N-acetilglucosamina, formando o arcabouço para a organização dos proteoglicanos (Chen et. al., 1999; Horton et. al., 1998). Também forma associação com colágeno, fibrina e outras moléculas da matriz extracelular. Está envolvido em várias etapas da reparação tecidual.

A resposta inicial à injúria inclui a formação de uma matriz extracelular rica em AH e fibrina que dá sustentação ao influxo de fibroblastos e células endoteliais no local da injúria e a subsequente formação do tecido de granulação. A síntese do AH contribui para a hidratação tecidual focal, resultando no enfraquecimento da ancoragem da célula à matriz extracelular e permitindo que a célula se destaque ou desligue temporariamente da matriz extracelular, facilitando a sua migração e divisão (Chen et. al., 1999).

O AH também está envolvido no direcionamento de linfócitos, retirada de radicais livres, e diretamente envolvido na angiogênese. Durante o processo de

angiogênese o AH é capaz de induzir a expressão de citocinas, quimocinas, espécies reativas de nitrogênio e fatores de crescimento que atuam diretamente na angiogênese (Chen et. al., 1999; Milinkovic et. al., 2004; Horton et. al., 1998; Tempel et. al., 2000) .

Durante o processo ativo de reparação tecidual, hialuronidases atuam sobre o AH nativo de alto peso molecular, considerado anti-angiogênico, gerando pequenos fragmentos de oligossacarídeos altamente angiogênicos (Chen et. al., 1999; Tempel et. al., 2000)

#### **1.6.5 Proteoglicano de Heparan Sulfato (PGHS), Sindecam-4**

HSPG consiste de uma glicoproteína que apresenta 1-4 cadeias de heparan sulfato ligadas covalentemente ao seu esqueleto protéico. As cadeias de HS constituem-se de repetidas unidades de dissacarídeos contendo uma N-acetilglucosamina e um ácido urônico, que pode variar de acordo com a sua sulfatação e epimerização.

As cadeias de HS se ligam a vários tipos de ligantes, inclusive à fatores de crescimento e outras moléculas da matriz extracelular. Os grupos sulfatos negativamente carregados dos HSPG participam na interação com as regiões básicas dos fatores de crescimento. Os HSPG podem atuar como ativadores ou supressores da atividade dos fatores de crescimento. Proteoglicanos de heparan sulfato da superfície celular auxiliam o posicionamento dos fatores de crescimento junto aos seus respectivos receptores, podendo atuar também como co-receptores. Os HSPG da matriz extracelular podem atuar como local de armazenamento de fatores de crescimento, sequestrando-os da superfície celular (Georges et. al., 2003; Gotte et. al., 2003).

No caso do VEGF, a ligação do fator de crescimento ao seu receptor é dependente dos HSPG. Esse proteoglicano até mesmo restaura a atividade do fator de crescimento afetado por agentes oxidativos (Georges et. al., 2003).

Os HSPG também regulam a distribuição de citocinas nos tecidos, retendo-as na superfície das células endoteliais e promovendo a formação de um gradiente que é liberado na ocasião de uma lesão no tecido, potencializando a atração de neutrófilos ao local de injúria (Proudfoot et. al., 2003; Wang et. al., 2005; Kirkpatrick et al).

Sindecam compreende uma família de proteoglicanos de heparam sulfato de superfície que estão envolvidos em um grande número de processos biológicos, incluindo a regulação da coagulação sanguínea, adesão celular e transdução de sinais. A família dos sindecans consiste em 4 genes intrinsecamente relacionados denominados sindecam -1, -2, -3 e sindecam-4. Os sindecam-1 e -4 são os mais estudados e são expressos em uma grande variedade de células adultas (Li et. al., 1997). Os sindecans estão presentes em vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, células musculares lisas e células epiteliais.

A superfície celular e a matriz extracelular do sistema cardiovascular apresenta uma grande quantidade proteoglicanos de heparam sulfato, sendo o sindecam um dos principais HSPG gerados dentro desse sistema (Rosenberg et. al., 1997).

### **1.6.6 Heparanase**

A heparanase é uma endoglicosidase-beta-glucuronidase que degrada o HS e que participa na degradação e remodelamento da matriz extracelular (Zetser et. al., 2004). A heparanase atua num estágio primordial da cascata angiogênica, degradando o arcabouço de polissacarídeo da membrana basal dos capilares e facilitando a invasão e migração de células endoteliais em direção aos fatores angiogênicos (Vlodavsky et. al.,

2001). Em um estágio inicial, também induz angiogênese por modular a atividade e biodisponibilidade de fatores de crescimento, clivando as cadeias de heparan sulfato dos proteoglicanos de superfície celular ligadas ao VEGF e FGF (Vlodavsky et. al., 2001).

Já em estados mais avançados do remodelamento cardíaco, foi observada uma correlação entre aumento da expressão da heparanase e a hipertrofia ventricular do miocárdio, em modelo experimental de ratos com hipertrofia e doença congestiva cardíaca induzida por isoproterenol (Kizaki et. al., 2005). Já a inibição da expressão da heparanase e diminuição da degradação do HS tem sido relacionada à maior sobrevivência do miócito, preservação parcial da matriz extracelular e melhora na recuperação da função cardíaca após o IAM (Yamauchi et. al., 2000).

### **1.6.7 Catepsina B**

Catepsina B é uma endoprotease que atua no remodelamento da matriz extracelular causando diretamente uma degradação proteolítica, ou indiretamente, amplificando a via de ativação de outras proteases que degradam a matriz extracelular.

A catepsina B indiretamente promove a proteólise por ativar o pró-plasminogênio de uroquinase, que por sua vez ativa a cascata proteolítica plasmina-metaloproteinases (MMP) (Almeida et. al., 2001). Essa cascata converte plasminogênio em plasmina que, juntamente com a catepsina B e elastase, ativa pro-MMP em MMP (Skrzydowska et. al., 2005). No remodelamento tissular, a importância da ativação e regulação da catepsina B reside no fato que as estruturas de colágeno na matriz extracelular estão envoltas e protegidas da degradação por proteoglicanos, fibronectina e laminina. A plasmina e a catepsina degradam essas glicoproteínas, permitindo que o colágeno possa ser degradado por metaloproteinases (Almeida et. al., 2001).

Além disso, a catepsina B pode alterar o balanço entre metaloproteinases e seus inibidores. Indiretamente ativando algumas metaloproteinases, como a pró-colagenase intersticial (pro-MMP-3 e pro-MMPs-2) e a prostomelisinina-1, e diretamente clivando e inativando os inibidores de metaloproteinase TIMP-1 e TIMP-2.

Durante a degradação proteolítica, alguns dos fatores de crescimento ligados à matriz extracelular são liberados (como o bFGF, EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-I e VEGF) , tornando disponível a modulação do remodelamento tecidual (Skrydlewska et. al., 2005).

Uma característica importante da catepsina B é a sua capacidade de ligação específica ao HS. Somente o HS é capaz de aumentar a estabilidade da catepsina B em pH alcalino (Almeida et. al., 2001). Alguns estudos sugerem que o HS da superfície celular é capaz de ancorar a catepsina B, influenciando a sua ação. A ligação de CatB e HS aumenta a meia vida da CatB em 5 vezes e muito provavelmente potencializa a ação endopeptidase da enzima na membrana celular. Além disso, essa ligação protege a catepsina da denaturação pelo pH alcalino durante o processo de clivagem de substratos protéicos (Almeida et. al., 2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

Estudar as alterações da matriz extracelular do miocárdio de ratos, seis semanas após a produção experimental de infarto agudo do miocárdio decorrentes da transferência intramiocárdica do plasmídeo contendo o segmento de cDNA do VEGF<sub>165</sub>.

### **Objetivos Específicos**

1. Diferenciar as alterações da matriz extracelular e o efeito da transferência gênica do pVEGF<sub>165</sub> de acordo com o tamanho do infarto, em grupos apresentando grande ou pequena área de infarto.
2. Estudar o perfil de glicosaminoglicanos sulfatados, heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato, 6 semanas após a indução do IAM, comparando sua quantificação entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.
3. Analisar a produção do glicosaminoglicano não sulfatado ácido hialurônico, avaliando o tamanho de seus fragmentos (de alta e baixo massa molecular) comparando sua quantificação entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>. Observar a presença no tecido cardíaco infartado por imunohistoquímica, comparando o padrão de distribuição do ácido hialurônico no tecido cardíaco entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.
4. Observar a presença do proteoglicano de heparam sulfato (Sindecam-4) por imunohistoquímica, comparando o padrão de sua distribuição no tecido cardíaco entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.

5. Investigar a presença da enzima heparanase por estudos de imunohistoquímica, comparando o padrão de sua distribuição no tecido cardíaco e a produção do glicosaminoglicano de heparam sulfato entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.
6. Investigar a presença do enzima catepsina B por estudos de imunohistoquímica, comparando o padrão de sua distribuição no tecido cardíaco entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.
7. Correlacionar a função cardíaca dos ratos submetidos ao IAM experimental obtidos com o ecocardiograma, comparando os resultados de sua fração de ejeção entre os grupos tratados e não tratados com o pVEGF<sub>165</sub>.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados desse trabalho estão divididos em duas partes: publicados e não publicados. Os resultados publicados foram apresentados nessa tese na forma de artigo científico.

A metodologia para obtenção desses resultados está descrita no texto dos artigos publicados, servindo de mesma base para os resultados aqui descritos, mas não ainda publicados.

#### **3.1 Resultados Publicados**

##### **3.1.1 Efeitos à longo prazo da transferência do gene do VEGF165 na fase aguda do infarto do miocárdio no remodelamento da matriz extracelular miocárdica**

(ANEXO 1).

**Referência bibliográfica:** FABIO D'AGUIAR MATAVELI<sup>1</sup>, SANG WON HAN<sup>2</sup>, HELENA BONCIANI NADER<sup>3</sup>, ALINE MENDES<sup>3</sup>, ROSE KANISHIRO<sup>4</sup>, PAULO TUCCI<sup>4</sup>, ANTONIO CARLOS LOPES<sup>1</sup>, JOSE CARLOS COSTA BAPTISTA-SILVA<sup>5</sup>, ANA PAULA CLETO MAROLLA<sup>3</sup>, LEONARDO PINTO DE CARVALHO<sup>2</sup>, PRISCILA MARTINS ANDRADE DENAPOLI<sup>2</sup>, & MARIA APARECIDA DA SILVA PINHAL<sup>3</sup>. **Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer in cardiac extracellular matrix remodeling.** *Growth Factors*. 2009 Feb; 27(1):22-31.

# ANEXO I

## **Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer in cardiac extracellular matrix remodeling.**

**FABIO D'AGUIAR MATAVELI 1, SANG WON HAN 2, HELENA BONCIANI NADER 3, ALINE MENDES 3, ROSE KANISHIRO 4, PAULO TUCCI 4, ANTONIO CARLOS LOPES 1, JOSE CARLOS COSTA BAPTISTA-SILVA 5, ANA PAULA CLETO MAROLLA 3, LEONARDO PINTO DE CARVALHO 2, PRISCILA MARTINS ANDRADE DENAPOLI 2, & MARIA APARECIDA DA SILVA PINHAL 3.**

1.Department of Internal Medicine, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 2.The Center for Gene Therapy, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 3.Department of Molecular Biology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 4.Department of Cardiovascular Physiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and 5. Department of Vascular Surgery, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Growth Factors*. 2009 Feb; 27(1): 22-31.

### **3.1.2 Síntese e produção de glicosaminoglicanos induzidas por fatores de crescimento são composto e célula-específicas.**

**Referência Bibliográfica:** Suarez, Eloah R., Nohara, Angela S., Mataveli, Fábio D., de Matos, Leandro L., Nader, Helena B. and Pinhal, Maria Aparecida S., (2007) 'Glycosaminoglycan synthesis and shedding induced by growth factors are cell and compound specific', Growth Factors, 25:1, 50 – 59 (ANEXO II)

## ANEXO II

**Glycosaminoglycan synthesis and shedding induced by growth factors are cell and compound specific.**

ELOAH R. SUAREZ<sup>1</sup>, ANGELA S. NOHARA<sup>2</sup>, **FÁBIO D. MATAVELI**<sup>3</sup>,  
LEANDRO L. DE MATOS<sup>1</sup>, HELENA B. NADER<sup>2</sup>, & MARIA APARECIDA S.  
PINHAL<sup>1,2</sup>

1. Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Fundação do ABC (FMABC), Av. Príncipe de Gales, 821, Santo André, SP CEP 09060-650, Brazil, 2. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Três de Maio, 100, São Paulo, SP CEP 04044-020, Brazil, and 3. Disciplina de Clínica Médica, UNIFESP, Rua Pedro de Toledo, 920, São Paulo, SP CEP 04039-002, Brazil

## **3.2 RESULTADOS NÃO PUBLICADOS**

### **3.2.1 Fração de ejeção e quantidade de glicosaminoglicanos por mg de tecido seco.**

Após 6 semanas da indução do IAM, todos os animais foram submetidos ao exame de ecocardiograma antes de serem sacrificados. O exame teve como objetivo calcular o tamanho do infarto na parede anterior do ventrículo esquerdo (VE), e mesurar a fração de ejeção (FE) como medida de função cardíaca.

Os grupos de animais foram divididos de acordo com o tamanho do infarto, ou seja, infartos que atingiam menos que 30% da parede anterior do VE, foram considerados pequenos, e infartos que atingiam mais que 30% da parede anterior do VE foram considerados infartos grandes.

Os animais foram divididos por tamanho de infarto e não por intenção de tratar, visto que o objetivo do estudo não era observar alguma melhora na função cardíaca dos animais tratados com o pVEGF<sub>165</sub>, mas sim investigar a interação do VEGF<sub>165</sub> humano produzido pelo plasmídeo com os elementos da matriz extracelular cardíaca nos animais tratados.

A análise estatística dos resultados da FE entre os ratos submetidos à transferência gênica, classificados no mesmo grupo de tamanho de infarto, não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa. Os resultados da FE em percentagem e quantificação dos GAG em µg/mg de tecido cardíaco estão apresentados na Tabela abaixo.

<b>Group</b>	<b>EF</b>	<b>HS</b>	<b>DS</b>	<b>CS</b>	<b>HA</b>
<b>SMI</b> (n=6)	61.3833 (22.7835)	0.2003 (0.4)	0.8696 (0.1218)	0.2746 (0.1497)	0.7623 (0.3991)
<b>LMI</b> (n=8)	33.7875 (10.7580)	0.3970 (0.1318)	0.6711 (0.1928)	0.3605 (0.2192)	3.8450 (1.3653)
<b>VEGF SMI</b> (n=5)	68.44 (16.8365)	0.1784 (0.2314)	0.6370 (0.3683)	0.0365 (0.0544)	5.2017 (0.8604)
<b>VEGF LMI</b> (n=10)	33.05 (10.2166)	2.5948 (1.6902)	4.1216 (1.7395)	4.9061 (3.5793)	13.6155 (14.0230)
<b>NL</b> (n=3)	68.863 (7.1316)	0.0448 (0.0309)	0.0458 (0.0374)	0.0005 (0.0009)	0.11491 (0.0504)

Tabela 1. SMI, Pequeno Infarto; LMI, Grande Infarto; VEGF Animais tratados com injeção do plasmídeo recombinante contendo VEGF<sub>165</sub>; NL animais controle sem infarto e sem tratamento. Os valores estão expressos em µg/g de tecido seco e os valores entre parênteses representam a média de cada grupo. Não foi observada correlação significativa entre FE e tratamento com o VEGF<sub>165</sub> entre os grupos tratados e não tratados com o VEGF.

#### **4. DISCUSSÃO**

A matriz extracelular desempenha um papel fundamental no remodelamento cardíaco pós IAM. O complexo arranjo de glicoproteínas fibrilares, colágeno, GAG e PG não só provê um suporte estrutural para a arquitetura do tecido cardíaco, como também uma grande variedade de sinais específicos para a migração e proliferação celular, ligação de fatores de crescimento, degradação por proteases e angiogênese (Hinton et. al., 2006; Gallagher, 2001; Mizutani et. al., 2001; Sugahara et. al., 2004).

Muitas evidências indicam uma direta correlação entre os eventos do ciclo celular e o metabolismo de GAG e PG, e a análise da composição e quantificação de GAG e PG no tecido cardíaco após a produção de um infarto pode ser de especial importância na compreensão desse processo de remodelamento cardíaco. A transferência gênica de um vetor que expressa um importante fator de crescimento que atua pós IAM pode nos mostrar a importância dessa interação entre matriz extracelular e VEGF no processo de remodelamento cardíaco.

Clinicamente, observa-se que infartos de pequena área têm uma resolução mais simples, com menores prejuízos tanto para a matriz extracelular cardíaca, como para a função efetiva desse órgão. A pré-existência de uma circulação colateral imatura e a resposta fisiológica à isquemia local compensam em sua grande maioria os efeitos deletérios desse tipo de infarto.

A maior preocupação clínica recai então sobre os infartos de extensa área, que levam a um remodelamento ineficiente da matriz extracelular cardíaca, com produção excessiva de colágeno, formando um tecido fibroso sem função contrátil. Com a perda de contratilidade e conseqüente diminuição de sua fração de ejeção, o coração procura compensar a área perdida sobrecarregando suas fibras ativas e gerando, a curto, médio e longo prazo, complicações fisiológicas e clínicas que levam à sua falência.

Por ser uma nova modalidade de tratamento, a transferência gênica de fatores de crescimento focou, no início de seus estudos, pacientes com patologia cardíaca avançada, como um recurso final quando outros recursos já haviam falhado.

Ao se intervir no tecido cardíaco que já sofreu um grande remodelamento patológico durante tantos anos, perdemos a possibilidade de observar qual seria a função real de uma suplementação terapêutica por uma produção constante de fatores de crescimento, que poderiam auxiliar e influenciar diretamente a resposta aguda e a médio prazo da matriz extracelular cardíaca. Tornou-se então importante estudar experimentalmente qual o impacto da transferência gênica do VEGF<sub>165</sub> na fase aguda do infarto agudo do miocárdio (Fam et. al., 2003).

O estímulo primário anterior à angiogênese é a isquemia, que resulta na ativação do fator alfa de indução devido à hipóxia (HIF- $\alpha$ ) nos miócitos, que por sua vez estimulam a expressão de VEGF e dos receptores de VEGF flt-1 (Simons et. al., 2001).

Os mecanismos de sinalização intracelular ativados pelo VEGF são essencialmente dependentes do heparan sulfato, tanto que células deficientes na síntese de heparan sulfato não são capazes de ativar a cascata de sinalização desencadeada por esse fator de crescimento (Iozzo et. al., 2001).

Pudemos observar que a produção de HS apresentou-se significativamente aumentada nos tecidos cardíacos que sofreram um grande infarto e foram tratadas com o VEGF<sub>165</sub> após 6 semanas da indução do infarto. Assim como o HS, todos os GAG apresentaram significativo aumento em relação ao grupo controle não infartado, ao grupo de infarto pequeno e grande não tratados, e ao grupo com pequeno infarto tratado com o pVEGF<sub>165</sub>.

*In vitro*, observamos o aumento da produção do HS especificamente na presença do VEGF<sub>121</sub>, mas o aumento em conjunto dos três glicosaminoglicanos sulfatados (HS,

DS e CS) em células endoteliais e musculares lisas ocorreu apenas quando o VEGF<sub>165</sub> estava presente (Suarez et. al., 2007).

Os resultados do ambiente *in vitro* nos auxiliam a entender um pouco mais sobre as ações específicas dos diferentes espécies moleculares do VEGF. Os resultados *in vivo*, por sua vez, nos auxiliam a entender como os diversos fatores de crescimento que atuam durante o processo do remodelamento cardíaco podem impactar conjuntamente na síntese e secreção dos glicosaminoglicanos.

Quando aplicamos o plasmídeo do cDNA do VEGF<sub>165</sub> no músculo cardíaco do rato logo após a indução do infarto, estamos fornecendo uma superexpressão de um único fator de crescimento em uma arena em que vários fatores de crescimento estão sendo superexpressos dentro do limite fisiológico do processo de reparação tecidual. O importante, nesse momento, é entender o quanto a superexpressão de um único fator de crescimento além do limite fisiológico pode amplificar de modo efetivo a ação dos outros fatores de crescimento durante o processo de reparação tecidual. Nesse trabalho, analisamos elementos da matriz extracelular que se ligam, alteram e respondem não somente à ação não de um único fator de crescimento, como por exemplo, o VEGF<sub>165</sub>, mas que interagem com uma plêiade de fatores que estão superexpressos nesse processo de remodelamento cardíaco após o infarto agudo do miocárdio.

Assim sendo, o aumento da quantidade de HS disponível não vai apenas estabilizar a ligação do VEGF<sub>165</sub> ao seu receptor de superfície celular, mas esse excesso de HS na matriz e superfície celular vai atuar estabilizando também a ligação do FGF 2 ao seu receptor de superfície celular, estimulando a atividade mitogênica desse fator de crescimento (Wu et. al., 2003).

Por outro lado, o FGF-2 também induz a expressão gênica do VEGF em células endoteliais, e o VEGF, por sua vez, estimula a ação mitogênica (*in vitro*) e angiogênica

do FGF-2 ( *in vivo*) (Seghezzi et. al., 1988). O sinergismo de ação entre os principais fatores de crescimento é um fator essencial para o sucesso de uma estratégia terapêutica no remodelamento cardíaco. Para se poder atuar de forma mais efetiva é necessário encontrar e estudar um ponto comum de interação dinâmica entre esses fatores.

Alguns pontos em comum foram encontrados em nosso trabalho, por exemplo, em nosso experimento *in vitro*, quando demonstramos que tanto o FGF2, como o EGF, o VEGF 121 e o VEGF 165 eram capazes de estimular a secreção de HS em células endoteliais (Suarez et. al., 2007). Pontos de sinergismo na ação de fatores de crescimento e sua relação e interação com elementos da matriz extracelular tornam-se cada mais vez mais importantes no estudo do remodelamento cardíaco. O estudo experimental em ratos que demonstrou que 43% e 80% dos genes regulados e induzidos pelo processo de remodelamento cardíaco 1 semana após o infarto agudo do miocárdio estarem relacionados a componentes da matriz extracelular é apenas um dos achados iniciais de um campo muito grande a ser explorado.

O tempo de ação da expressão gênica do vetor contendo o fator de crescimento no processo de remodelamento cardíaco é outro ponto importante.

Encontramos, no grupo tratado com o pVEGF<sub>165</sub> e apresentando uma grande área de infarto, indícios de uma matriz extracelular ativa e produzindo componentes diretamente relacionados ao processo de remodelamento e angiogênese: uma significativa quantidade de GAG em relação aos outros grupos experimentais, ácido hialurônico de baixo peso molecular, uma maior expressão de catepsina B nos tecidos, e uma menor expressão de heparanase (que pode ser diretamente relacionada à uma maior quantidade de HS presente nas amostras desse grupo). O interessante é que esses resultados foram obtidos 6 semanas após a indução do infarto. Se levarmos em

consideração que o pico de expressão de um plasmídeo contendo um cDNA é de aproximadamente 10 dias após a transferência gênica, esses valores nos mostram indícios de que intervenções, mesmo que pontuais, no início do processo de remodelamento cardíaco podem acarretar em significativas mudanças no resultado tardio de remodelamento cardíaco.

Outro ponto a ser levado em consideração, é a conjunção de fatores diversos contribuindo para a obtenção desse resultado. O aumento significativo encontrado no grupo LMI VEGF na quantidade dos SGAG HS, DS e CS ocorreu devido à coexistência de 2 fatores que distinguem esse grupo dos demais: o tamanho do infarto e a transferência do pVEGF<sub>165</sub> (figura 4, anexo I). Esse achado demonstra que algumas intervenções dependem não apenas da ação do gene estudado, mas também de outras condições estruturais da lesão e do resultado que se procura obter. Infartos grandes e pequenos não submetidos a transferência gênica não apresentaram alterações significativas na sua produção de SGAG. Por outro lado, mesmo o infarto pequeno submetido à transferência gênica não apresentou resultados significativos. Isso demonstra que a transferência gênica, nesse caso, não foi fator único e principal para o aumento significativo da produção de SGAG. O componente estrutural tamanho do infarto não estava presente e o resultado obtido foi diferente do observado no grupo VEGF LMI (infarto grande submetido à transferência gênica). Mais interessante ainda é a interação estatística desses fatores sobre diferentes componentes da matriz extracelular. O ácido hialurônico é o único GAG que não apresenta sulfatação em sua cadeia, não formando ligações com esqueletos protéicos como os demais GAG sulfatados (ex: HS que se liga a um esqueleto protéico formando o sindecam 4, que é um proteoglicano de heparan sulfato). Não ocorreu interação estatística entre transferência gênica e tamanho do infarto observado na quantidade de HÁ encontrada

nas amostras dos grupos experimentais, ou seja, enquanto os SGAG apresentavam um significativo aumento apenas quando observado um infarto grande e transferência gênica, a quantidade de HÁ foi relacionada diretamente ao tamanho de infarto, pois o grupo LMI (com ou sem transferência gênica) apresentou uma maior quantidade de ácido hialurônico em relação ao seus respectivos controles SMI (com ou sem transferência gênica).

Isso quer dizer que uma mesma intervenção no miocárdio pode apresentar resultados diferentes no processo de remodelamento da matriz extracelular de acordo com o tamanho do infarto e de acordo com a estrutura molecular estudada, mesmo em moléculas de um mesmo grupo, como observado aqui com os glicosaminoglicanos.

## 5. Conclusões

1. VEGF<sub>165</sub> estimula a síntese de GAG *in vivo* e *in vitro*;
2. O aumento significativo de GAG sulfatado foi observado em animais tratados com o VEGF<sub>165</sub> que apresentaram grande área de infarto;
3. O tratamento com o VEGF<sub>165</sub> aumentou o HÁ de baixa massa molecular, que apresenta alto potencial angiogênico.
4. Animais tratados com transferência gênica do VEGF<sub>165</sub> demonstraram, em estudos histoquímicos, diminuição da expressão da enzima heparanase, corroborando com o aumento do heparan sulfato.
5. A transferência gênica com o VEGF<sub>165</sub> promoveu aumento significativo da expressão da Catepsina B.
6. A terapia gênica com o fator de crescimento VEGF<sub>165</sub> promoveu alterações significativas de componentes da matriz extracelular na fase tardia do remodelamento cardíaco após indução do infarto agudo do miocárdio.

## 6. Referências Bibliográficas

- Brimacombe JS, Weber JM - Mucopolysaccharides. Chemical structure, distribution and isolation. (B.B.A. Library), Elsevier Publishing Company, New York, 1964, 1-181.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*. 2003, 9: 653-660.
- Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of Hyaluronan in Wound Repair. *Wound Rep Reg*. 1999, 7:79-89.
- Cohen, Diegelmann, Lindblad .Wound Healing, Biochemical & Clinical Aspects. 1992. Ed. W. B. Sanders Company.
- Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician Guide to Angiogenesis. *Circulation*. 2003, 108:2613-2618.
- Ferrara N.; Henzel, W.J.. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 161: 851-859.
- Ferrara, N.. Vascular Endothelial Growth Factor. *European Journal of Cancer* 1996, 3: 2413-2422.
- Ferrara, N.. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Regulation of Angiogenesis. *Kidney International*. 1999, 56: 794-814.
- Fransson, L. A. Structure of dermatan sulfate. III. The hybrid structure of dermatan sulfate from umbilical cord. *J. Biol. Chem*. 1968, 243: 1504-10.
- Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest*. 2001, 108:357-361.
- Georges. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Binding and Activity by Extracellular pH. *J Biol Chem*. 2003. 278: 19518-19525.

Gonçalves, L. M., Epstein, S. E., Piek, J. J.. Controlling collateral development: the difficult task of mimicking mother nature. *Cardiovascular Research*. 2001, 49: 495-496.

Gotte, M. Syndecans in inflammation. *FASEB J*. 2003, 17:575-91.

Henke CA, Roongta U, Mickelson DJ, Knutson JR, McCarthy JB. CD44-related Chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *J Clin Invest*. 1996, 97:2541-2552.

Hinton RB, Lincoln L, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, DW Benson, Yutzey KE. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res*. 2006, 98:1431-1438.

Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Regulation of Hyaluronan-Induced Chemokine Gene Expression by IL-10 and IFN-g in Mouse Macrophages. *J Immunol*. 1998, 160:3023–3030.

Iozzo, R. V. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Clin. Invest*. 2001, 108:165–167.

Iozzo, R. V., San Antonio, J. D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J. Clin. Invest*. 2006, 108:349–355.

Jakerman, L.B.; Amanini, M.; Phillips, H.S.; Ferrara, N.. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*. 1993,133,848-859.

Milinkovic M, Antin JH, Hergrueter CA, Underhill CB, Sackstein R. CD44-hyaluronic acid interactions mediate shear-resistant binding of lymphocytes to dermal endothelium in acute cutaneous GVHD. *Blood*. 2004, 103:740-742.

Keck, Pamela J.; Hauser, Scott D.; Krivi, Gwen; Sanzo, Kim; Warren, Thomas; Joseph, Feder; Connolly, Daniel T. Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen Related to PDGF. *Science*. 1989, 24:1309-1312.

Kizaki K, Okada M, Ito R, Yoshioka K, Hashizume K, Mutoh K, Hara Y. Induction of Heparanase Gene Expression in Ventricular Myocardium of Rats with Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28:2331-2334.

Langford, JK, Stanley MJ, Cao D, Sanderson RD. Multiple Heparan Sulfate Chains Are Required for Optimal Syndecan-1 Function. *J Biol Chem*. 1998, 273: 29965–29971.

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 2000, 342:626-33.

Leung, David W.; Cachianes, George; Kuang, Wun-Jing; Goeddel, David V.; Ferrara, Napoleone. Vascular Endothelial Growth Factor is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science*. 1989, 24:1306-1309.

Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M. Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res*. 1997, 81:785-796.

Matsunaga T, Waltier DC, Wiehrauch DW, Moniz M, Tessmer J, Chilian WM. Ischemia-Induced Coronary Collateral Growth is Dependent on Vascular Endothelial Growth Factor and Nitric Oxide. *Circulation*. 2000, 102:3098-3103.

Michelacci YM, Dietrich CP. Isolation and partial characterization of an individual chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1974, 56: 973-980.

Michelacci YM, Dietrich CP. The structure of chondroitin sulfates. *Biochim. Biophys. Acta*. 1976, 451: 436-443.

Michelacci YM, Mourão PAS, Laredo J, Dietrich CP. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. *Connec Tissue Res.* 1979, 7: 29-36.

Michelacci YM, Dietrich CP.. Structure of chondroitin sulfate from whale cartilage: distribution of 6- and 4-sulphated oligosaccharides in the polymer chains. *Int J Macromo.* 1986, 8:108-113.

Milinkovic M, Antin JH, Hergueter CA, Underhill CB, Sackstein R. CD44-hyaluronic acid interactions mediate shear-resistant binding of lymphocytes to dermal endothelium in acute cutaneous GVHD. *Blood.* 2004, 103:740-742.

Mizutani K, Kawashima S, Ueyama T, Sakoda T, Takeuchi S, Kobayashi S, Yokoyama M, Hayashi Y, Itoh H. Heparin and heparan sulfate inhibit extracellular signal-regulated kinase activation and myocardial cell hypertrophy induced by endothelin-1. *Kobe J Med Sci.* 2001, 47:47-58.

Patterson, Cam; Runge, Marschall S. Therapeutic Myocardial Angiogenesis Via Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy. Moving on Down the Road. *Circulation.* 2000, 102:940-942.

Penc SF, Pomach B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Gallo RL. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem.* 1988, 273: 28116-21.

Poblacion CA, Michelacci YM. Structural differences of dermatan sulfates from different origins. *Carbohy. Res.* 1986, 147: 87-100.

Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L. Heparan Sulfate Proteoglycans of the Cardiovascular System. Specific Structures Emerge But How Is Synthesis Regulated? *J Clin Invest.* 1997, 99:2062-2070.

Rosengart TK, Lee LY, Patel, Shailen R. Angiogenesis Gene Therapy, Phase I Assessment of Direct Intramyocardial Administration of an Adenovirus Vector Expressing VEGF121 cDNA to Individuals with Clinically Significant Severe Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1999, 100:468-474.

Skrzydłowska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2005, 11:1251-1266.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol*. 1998, 107: 743–751.

Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues. *FASEB J*. 1992,6: 2639-2645.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*. 1998, 141:1659-73.

Seinger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvirak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983, 219:983-985.

Suarez ER, Nohara AS, Mataveli FD, de Matos LL, Nader HB, Pinhal MAS. Glycosaminoglycan synthesis and shedding induced by growth factors are cell and compound specific. *Growth Factors*. 2007, 25:50–59.

Sugahara KN, Hirata T, Murai T, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides and tumor progression. *TIGG*. 2004, 16:187–197.

Tempel C, Gilead A, Neeman M. Hyaluronic acid as an anti-angiogenic shield in the preovulatory rat follicle. *Biol Reprod.* 2000, 63:134–140.

Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest.* 2001, 108:341–347.

Waltenberger, J. Modulation of Growth Factor Action. Implications for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Circulation.* 1997, 96:4083-4094

Wu ZL, Zhang L, Yabe T, Kuberan B, Beeler DL, Love A, Rosenberg RD. The involvement of heparan sulfate (HS) in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex. *J Biol Chem.* 2003, 19:17121–17129.

Yamauchi H, Desgranges P, Lecerf L, Papy-Garcia D, Tournaire M, Moczar M, Loisançe D, Barritault D. New agents for the treatment of infarcted myocardium. *The FASEB J.* 2000, 14:2133-2134.

Zetser A, Levy-Adam F, Kaplan V, Gingis-Velitski S, Bashenko Y, Schubert S, Flugelman MY, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase is a endo- $\beta$ -D-glucuronidase specific for heparan sulfate cleavage. Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes. *J Cell Sci.* 2004, 117:2249-2258.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)