

**FERNANDA DE ASSIS ARAÚJO**

**Avaliação dos efeitos de estatinas na  
angiogênese inflamatória em  
camundongos**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FERNANDA DE ASSIS ARAÚJO**

# **Avaliação dos efeitos de estatinas na angiogênese inflamatória em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.  
Área de concentração: Fisiologia

ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> SÍLVIA PASSOS ANDRADE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
2009

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CNPq

Dedico este trabalho à minha mãe e Ivana, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos... Estes são sempre difíceis pra mim. Como expressar em palavras meus pensamentos e mais, meus sentimentos, da forma como realmente são? Sinceramente, não sei se consigo ou se isto é possível. Por exemplo, como escrever aqui, neste papel, tudo o que existe em mim a respeito da minha “mãe científica”, Sílvia? Sílvia representa muito mais que “uma orientação”. Suas contribuições no meu aprendizado vão além do laboratório e da pesquisa. Agradeço cada palavra ouvida e muitas vezes falada ao longo desses anos e que tiveram, muitas vezes, poder de decisão na minha vida, ou que me acolheram e me acalmaram quando eu mais precisava. Aliás, esta é uma das características que mais admiro na Sílvia! Ter a palavra certa na hora exata. Isto pra mim é sabedoria! Como orientadora é muito atenciosa e dedicada, calma quando deve ser e brava, ou melhor, firme, quando necessário. Sempre muito perspicaz! Aprendi muito nesses anos de convívio, e ainda não aprendi nada!!! A cada dia descubro que ela tem uma carta guardada na manga, algo que quero e preciso aprender. Talvez este seja o seu poder de nos “prender” a ela. Vivo dizendo: “não largar a Sílvia por nada!!!”. E é isso mesmo! Enquanto eu puder, e ela deixar... claro...rs... estarei por perto, tentando sugar tudo!rsrsrs... Portanto, Sílvia, ainda não foi desta vez que se livrou de mim!!!

E da “mãe científica”, passo para a “mãe biológica”... Marina, minha “piruinha-chamunita”...risos. Como agradecer aos 33 anos de aprendizado, carinho, amor e dedicação??? Sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando, torcendo por mim, sorrindo e chorando comigo... Este é o exemplo de mulher na minha vida! Há anos venho seguindo seus passos... Esta conquista é nossa! Te amo!

Agradeço a Ivana, que me incentivou a voltar para a pesquisa, que me mostrou o quanto a pesquisa está em mim e que eu não poderia fugir disso... Agradeço por ter ficado ao meu lado, apoiado sempre, com muito carinho, dedicação e atenção. Enfrentando os momentos complicados, perdendo finais de semana comigo no laboratório, e às vezes tendo que ouvir e discutir sobre assuntos que nem dominava direito... mas estava ali, dando força. Você foi fundamental durante estes 3 anos!

Não posso deixar de agradecer à grande amiga Déia! Que apesar de ter participado pouco desta etapa, não posso me esquecer que foi ela a grande incentivadora da pesquisa em mim, e que sem ela talvez hoje eu não estivesse aqui... Déia foi, e sempre será, minha “mestra”! Pessoa que admiro e me espelho em muitos momentos da minha vida profissional. Obrigada amiga, você é especial.

Agradeço aos meus irmãos, “Dodão” e “Pakito”, que mesmo em muitos momentos não entendendo o porquê dos meus estudos, estão ali, me apoiando e orgulhosos de mim... Cada um do seu jeito... Dodão, sempre brincalhão, minha criança grande... interessado no meu trabalho, mesmo não entendendo quase nada do que eu falo, sempre pergunta curioso! Kito é o oposto, sério, calado... não entende muito meus dias de estudo, finais de semana corrigindo provas... como ele mesmo diz: “você precisa estudar menos e aproveitar mais a vida... o tempo passa!”. Esse é o jeito dele dizer que ama e se preocupa... Amo vocês dois e sou muito feliz por tê-los em minha vida!!!

Uma “pessoa-chave” na realização deste trabalho foi a Monaliza. Sem ela nem sei o que seria de mim...risos. Em grande parte deste trabalho ela esteve presente, sempre com muito cuidado, dedicação e critério. Este trabalho é nosso! Obrigada por tudo!

Agradeço também à amiga Lu (Lucíola), que além de ter se tornado uma amiga, dentro e fora do laboratório, é uma pesquisadora que admiro muito.... Quando eu crescer quero ser assim... igual a Lu...risos... Quero agradecer por todas as vezes que me ouviu e discutiu meus resultados com uma atenção e paciência que nem todos têm. Agradecer pelas horas ao telefone me acalmando, me aconselhando ou apenas rindo... Ainda tenho muito que aprender com a Lu... e se tudo der certo, este aprendizado está apenas começando... Obrigada, Lu! Pela amizade, pelas conversas, pela confiança e pelas oportunidades.

Agradeço aos grandes amigos (as) como: Ádna, Tia Rosa, Guilherme (víbora), Giselle Divino, Gioconda (Ioka), Dan e Bela. Obrigada pelo carinho, amizade e força! Vocês não imaginam o quanto são importante pra mim. Amo vocês!!!

Ao Fred, namorado da minha mãe, pela atenção e carinho ao longo desses anos e por se orgulhar de mim como um pai se orgulha de uma filha.

Aos novos colegas de laboratório: Brígida, Evandro, Ludmila, Luiza, Maria Cecília, Raiana, Sandra e Tiago, que apesar do pouco contato, tivemos bons momentos no laboratório.

Agradeço em especial à Ju. Afinal, entramos praticamente juntas no laboratório e ao longo desses anos vivemos muitas coisas, momentos bons e outros nem tanto... mas, posso dizer que aprendi muito e Ju sem dúvidas é parte disso!

Aos meus alunos, que tiveram que, de certo modo, viver comigo o estresse de alguns momentos do doutorado. Obrigada pela paciência com datas e entregas de trabalhos e provas. Obrigada pelas palavras de carinho e por entenderem momentos difíceis nessa jornada.

Agradecimento a três alunos em especial: Tatiana, Juliele e Puebla, muito carinhosos e atenciosos, me prestigiando sempre que possível com suas presenças. Vocês são especiais!

Aos colegas de trabalho, professores e coordenadores, pelo carinho e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar.

A todos aqueles que por algum motivo me falham à memória nesse momento mas que fizeram parte direta ou indiretamente desta etapa me apoiando e torcendo por mim.



“Não é o mais forte que sobrevive,  
nem o mais inteligente, mas o que  
melhor se adapta às mudanças”.

(Charles Darwin)

## RESUMO

Estatinas, compostos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA), são drogas de escolha para o tratamento das hiperlipidemias, sendo consideradas a primeira linha terapêutica para a prevenção da doença cardíaca coronariana e aterosclerose. Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que estes compostos têm efeitos independentes da redução do colesterol sobre a função endotelial, estabilidade de placas ateroscleróticas, atividade de plaquetas, coagulação, oxidação e respostas inflamatórias e imunológicas. Nós avaliamos os componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido conjuntivo fibrovascular induzido por implantes de esponjas subcutâneas e abdominais em camundongos e sua modulação pela atorvastatina e fluvastatina. Nossos resultados mostraram que a atorvastatina (0,6 e 3 mg/kg/dia) é um inibidor da angiogênese (aproximadamente 54% no conteúdo de hemoglobina-Hb e 50% nos níveis de VEGF do implante), da inflamação (redução de 80% na atividade de macrófagos-NAG, 55% e 23% nas citocinas TNF- $\alpha$  e MCP-1, respectivamente) e fibrogênese (redução média de 38% na deposição de colágeno e 26% nos níveis de TGF- $\beta$ 1) em implantes subcutâneos. Em contraste, esta estatina não exerceu qualquer efeito na angiogênese inflamatória em implantes abdominais. Já a fluvastatina (0,6 e 6 mg/kg/dia) inibiu tanto a angiogênese quanto a inflamação nos implantes subcutâneos (51% do conteúdo de Hb e 71% nos níveis de VEGF; 33% da atividade NAG e 67% nos níveis de TNF- $\alpha$ ) e abdominais (36% do conteúdo de Hb, 62% na atividade MPO, 47% de NAG, 70% nos níveis de TNF- $\alpha$  e 37% nos níveis de MCP-1). Diferentemente da atorvastatina a fluvastatina foi ineficaz em alterar a deposição do colágeno em ambos os implantes. Efeitos opostos da fluvastatina foram observados quanto a produção de óxido nítrico (NO) nos implantes subcutâneos e abdominais. Esta estatina inibiu o NO nos implantes subcutâneos e estimulou sua produção em implantes abdominais. Os tecidos em proliferação apresentaram sensibilidade diferencial as estatinas e estas exerceram efeitos seletivos dependendo do compartimento anatômico onde o processo patológico se instalou.

Palavras-chave: Atorvastatina, Fluvastatina, Angiogênese, Inflamação, Fibrogênese.

## ABSTRACT

Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA), are the most prescribed drugs for treating hyperlipidemic disorders and for prevention of atherosclerosis. Clinical and experimental studies have shown that statins possess other beneficial effects on inflammation and immunological diseases. We evaluated the inflammatory, angiogenic and fibrogenic components of the fibrovascular tissue induced by subcutaneous or abdominal implants in mice and their modulation by atorvastatin and fluvastatin. Our results showed that atorvastatin (0.6 and 3 mg/kg/day) inhibited hemoglobin (Hb) content and VEGF levels in subcutaneous implants. The inflammatory component as assessed by NAG activity and cytokines levels were also decreased by the compound. Similarly, the statin was able to reduce collagen deposition and the levels of TGF- $\beta$ . In contrast, atorvastatin had no effect in the same parameters in abdominal implants. The other statin, fluvastatin reduced angiogenesis (HB content and VEGF levels) and inflammation (NAG activity, TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels) in both types of implants, but was without effect on collagen deposition. Opposing effects of fluvastatin were observed on nitric oxide production. Thus, in subcutaneous implants the statin decreased NO production but increased in abdominal implants. The inhibitory function of the statins on multiple parameters of the main components of inflammatory angiogenesis revealed in this study is clearly associated with the modulatory effects of HMG-CoA reductase on VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and NO production. Furthermore, differential effects of statins were observed depending on the location of the pathological proliferating tissue.

Key words: angiogenesis, inflammation, cytokines, nitric oxide, implants

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

	PÁG.
FIGURA 1 - Desenvolvimento de vasos no embrião.....	26
FIGURA 2 - Etapas da angiogênese.....	30
FIGURA 3 - Moléculas da atorvastatina e fluvastatina.....	48
FIGURA 4 - Cortes histológicos de implantes subcutâneos tratados com atorvastatina .....	61
FIGURA 5 - Cortes histológicos de implantes subcutâneos tratados com fluvastatina .....	80
FIGURA 6 - Cortes histológicos de implantes abdominais tratados com fluvastatina .....	90
QUADRO 1 - Efeito da atorvastatina dose 30 mg/kg implante abdominal.....	76
QUADRO 2 - Efeito do tratamento intraperitoneal com atorvastatina no implante abdominal.....	77
QUADRO 3 - Efeito do pré-tratamento com atorvastatina no implante abdominal.....	77
QUADRO 4 - Efeito do tratamento com atorvastatina por 4 dias no implante abdominal.....	78
QUADRO 5 - Resumo dos efeitos das estatinas em implantes subcutâneos e abdominais.....	99

## LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
GRÁFICO 1 - Efeito da atorvastatina na angiogênese de implante subcutâneo.....	63
GRÁFICO 2 - Efeito da atorvastatina na inflamação de implante subcutâneo....	65
GRÁFICO 3 - Efeito da atorvastatina nas citocinas inflamatórias de implante subcutâneo.....	66
GRÁFICO 4 - Efeito da atorvastatina na deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1 de implante subcutâneo.....	68
GRÁFICO 5 - Comparação da resposta angiogênica em implantes subcutâneos e abdominais.....	70
GRÁFICO 6 - Comparação da resposta inflamatória em implantes subcutâneos e abdominais.....	70
GRÁFICO 7 - Efeito da atorvastatina na angiogênese de implante abdominal..	72
GRÁFICO 8 - Efeito da atorvastatina na inflamação de implante abdominal.....	73
GRÁFICO 9 - Efeito da atorvastatina em citocinas inflamatórias de implante abdominal.....	74
GRÁFICO 10 - Efeito da atorvastatina na deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1 de implante abdominal.....	75
GRÁFICO 11 - Efeito da fluvastatina na angiogênese de implante subcutâneo...	82

GRÁFICO 12 - Efeito da fluvastatina na inflamação de implante subcutâneo.....	84
GRÁFICO 13 - Efeito da fluvastatina nas citocinas inflamatórias de implante subcutâneo.....	85
GRÁFICO 14 - Efeito da fluvastatina na deposição de colágeno de implante subcutâneo.....	86
GRÁFICO 15 - Efeito da fluvastatina na produção de NO de implante subcutâneo.....	88
GRÁFICO 16 - Efeito da fluvastatina na angiogênese de implante abdominal.....	92
GRÁFICO 17 - Efeito da fluvastatina na inflamação do implante abdominal.....	94
GRÁFICO 18 - Efeito da fluvastatina em citocinas inflamatórias de implante abdominal.....	95
GRÁFICO 19 - Efeito da fluvastatina na deposição de colágeno de implante abdominal.....	96
GRÁFICO 20 - Efeito da fluvastatina na produção de NO de implante abdominal.....	98

## LISTA DE ABREVEATURAS

ABD - Abdominal

aFGF – Fator de crescimento de fibroblasto ácido

APO-B – Apoproteína B

b-FGF - Fator de crescimento de fibroblastos básico

BSA – Albumina bovina sérica

COX-2 – Cicloxigenase 2

CRP – Proteína C reativa

CT – Controle

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo

d.C – depois de Cristo

EC – Célula endotelial

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

eNOS – Enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPC – Célula progenitora endotelial

FBS – Fibrosina

FDA – *Food and Drug Administration*

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

FPP – Farnesil pirofosfato

GGPP – Geranilgeranil pirofosfato

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GTPase – Enzima trifosfato de guanosina

Hb – Hemoglobina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HE – Hematoxilina-eosina

HGF – Fator de crescimento do hepatócito

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

I-CAM- Molécula de adesão intracelular

i.p - Intraperitoneal

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10  
INF - Interferon  
iNOS – Enzima óxido nítrico sintase induzida  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
LPS – Lipopolissacarídeos  
MEC – Matriz extracelular  
MMP – Metaloproteinase  
MPO – Mieloperoxidase  
MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos  
NAG - N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase  
NF- $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappaB  
NO - Óxido Nítrico  
nNOS – Enzima óxido nítrico sintase neural  
NOS – Enzima óxido nítrico sintase  
O.D. – Densidade óptica  
OPD – O-fenilenodiamina  
PA – Ativador de plasminogênio  
PAF - Fator ativador plaquetário  
PBS – Tampão fosfato salina  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta  
PD-ECGF - Fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaqueta  
PI3 kinase/Akt - Fosfatidilinositol quinase-3/ serina/treonina quinase  
PIGF – Fator de crescimento placentário  
PMN - Polimorfonuclear  
SC - Subcutâneo  
SREBP – Proteína ligante do elemento regulador de esterol  
TGF - Fator de crescimento transformante  
TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformante beta  
TIMP – Inibidor tecidual de metaloprotease  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa  
tPA – Ativador de plasminogênio tecidual  
uPA – Uroquinase ativadora de plasminogênio  
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular



VEGFR – Receptor para fator de crescimento do endotélio vascular

$^{133}\text{Xe}$  – Xenônio radioativo

## SUMÁRIO

	PAG
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Inflamação.....	21
1.1.1 Etapas da resposta inflamatória.....	22
1.2 Angiogênese.....	24
1.2.1 Etapas e mecanismos de regulação da angiogênese.....	27
1.3 Angiogênese e inflamação.....	31
1.4 Reparo tecidual.....	32
1.5 Fibrose.....	35
1.6 Estatinas.....	36
1.6.1 Mecanismo de ação das estatinas.....	38
1.7 Angiogênese, inflamação, fibrose e estatinas.....	39
1.8 Modelo de implante de esponjas.....	43
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	45
2.1 Objetivo geral.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
3.1 Animais.....	48
3.2 Drogas.....	48
3.3 Técnica de implantação.....	49
3.4 Protocolos experimentais.....	50
3.4.1 Atorvastatina.....	50
3.4.2 Fluvastatina.....	51
3.5 Remoção dos implantes e coleta de sangue.....	52
3.6 Avaliação sérica de lipídeos.....	52
3.7 Histologia.....	52
3.8 Avaliação da angiogênese e da infiltração tecidual.....	53
3.8.1 Dosagem de hemoglobina.....	53

3.8.2	Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	54
3.8.3	Avaliação da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	55
3.9	Avaliação da deposição de colágeno.....	55
3.10	Dosagem de citocinas.....	56
3.11	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	57
3.12	Análises estatísticas.....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
4.1	Efeito da atorvastatina na inflamação, angiogênese e deposição de colágeno subcutâneo.....	60
4.1.1	Avaliação histológica.....	60
4.1.2	Avaliação da angiogênese.....	62
4.1.3	Avaliação da inflamação.....	64
4.1.4	Avaliação da deposição de colágeno e TGF-β1.....	67
4.2	Efeito da atorvastatina na inflamação, angiogênese e deposição de colágeno abdominal.....	69
4.2.1	Protocolo 1 – Administração sistêmica da atorvastatina.....	71
4.2.2	Protocolo 2 – Administração local da atorvastatina.....	76
4.2.3	Protocolo 3 – Pré-tratamento sistêmico da atorvastatina.....	77
4.2.4	Protocolo 4 – Tratamento sistêmico da atorvastatina por 4 dias.....	78
4.3	Efeito da fluvastatina na angiogênese inflamatória em implantes subcutâneos.....	79
4.3.1	Avaliação histológica.....	79
4.3.2	Avaliação da angiogênese.....	81
4.3.3	Avaliação da inflamação.....	83
4.3.4	Avaliação da deposição de colágeno.....	86
4.3.5	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	87
4.4	Efeito da fluvastatina na angiogênese inflamatória em implantes abdominais.....	89
4.4.1	Avaliação histológica.....	89
4.4.2	Avaliação da angiogênese.....	91
4.4.3	Avaliação da inflamação.....	93
4.4.4	Avaliação da deposição de colágeno.....	96

4.4.5	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	97
4.4.6	Resumo dos resultados.....	99
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>141</b>
	ANEXO A – Publicação	
	ANEXO B – Resumo FeSBE 2009	

# **INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

A inflamação, a angiogênese e o remodelamento são componentes que atuam simultânea e sinergicamente no reparo tecidual. No entanto, a exacerbação de um ou mais destes componentes pode resultar em reparos aberrantes ou deficientes. Além disso, em uma variedade de condições patológicas (artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose, diabetes, doença de Crohn, câncer, aderências), o processo inflamatório, a neo-formação vascular e a deposição da matriz extracelular são persistentes e contribuem para a manutenção e agravamento destas doenças. Múltiplos fatores e mecanismos atuam de forma coordenada para o controle temporal e espacial destes eventos, particularmente, as citocinas. Dentre elas, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento tumoral (TNF) e o fator de crescimento transformante (TGF) estão envolvidos sendo responsáveis direta ou indiretamente pelos eventos celulares e moleculares desencadeados durante os três processos. A pesquisa científica tem centrado esforços no sentido de identificar agentes terapêuticos com propriedades anti-angiogênicas, anti-inflamatórias e anti-fibrogênicas que possam ser utilizados no combate e/ou prevenção de vários processos patológicos onde estes componentes co-existem. Uma gama de compostos com tais propriedades disponíveis no mercado e utilizados para outros fins terapêuticos tem sido reportados. Dentre estes, destacam-se as estatinas usadas primariamente no controle de colesterol. Recentemente, outros efeitos completamente distintos tem sido descritos como, por exemplo, em processos inflamatórios sistêmicos e outras condições patológicas onde a neovascularização, a inflamação e a fibrose estão associadas. Entretanto, muitos resultados ainda são controversos e os mecanismos envolvidos ainda não são completamente caracterizados. Neste estudo, avaliamos o efeito de duas estatinas (atorvastatina e fluvastatina) na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos alojados em dois compartimentos anatômicos distintos (espaço subcutâneo e cavidade abdominal).

## 1.1 – Inflamação

Conforme revisado por Libby, 2007, a inflamação é reconhecida desde a antiguidade quando Celsus, escritor romano do primeiro século d.C., documentou quatro sinais e sintomas típicos da resposta à lesão, conhecidos como sinais cardinais: *rubor* (vermelhidão, devido à hiperemia), *tumor* (inchaço, causado pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), *calor* (aumento da temperatura devido às mudanças no fluxo sanguíneo e atividade metabólica de mediadores celulares da inflamação), e *dolor* (dor, devida, em parte, a mudanças na perivasculatura e associada às terminações nervosas). Em 1850, Rudolf Virchow acrescentou um quinto sinal, o *functio laesa* (perda da função, devido à disfunção dos órgãos envolvidos).

A resposta inflamatória é um processo complexo que requer fatores e tipos celulares distintos, os quais, de forma coordenada, controlam o dano tecidual contra injúria por agentes patogênicos, traumáticos ou tóxicos. O processo inflamatório é altamente coordenado por moléculas pró- e anti-inflamatórias que regulam a quimiotaxia, migração e proliferação celular. A inflamação, geralmente, termina com um processo de reparo. No entanto, se esse processo não é corretamente ordenado, resulta em uma inflamação persistente (BENELLI et al., 2006; CHARO & RANSOHOFF, 2006; CHARO & TAUBMAN, 2004).

Tanto a inflamação que evolui para a cura como as inflamações persistentes apresentam etapas ou momentos semelhantes como irritação, alterações vasculares, exsudação plasmática e celular, lesões degenerativas e necróticas, proliferação conjuntiva e vascular reparadora e modificações das células do exsudato. Tais fenômenos inflamatórios não são isolados no tempo. Embora tenham seu início em momentos sucessivos, muitas vezes eles se superpõem durante o desenrolar do processo (PEREIRA, 2006).

### 1.1.1 – Etapas da resposta inflamatória

A resposta inflamatória engloba uma complexa rede de sinais químicos que promovem alterações vasculares e celulares os quais irão iniciar e sustentar uma resposta ao dano tecidual no hospedeiro (COUSSERS & WERB, 2002).

Após a lesão tecidual, há produção e liberação de vários mediadores como citocinas, histamina, proteases e eicosanóides (COUSSERS & WERB, 2002), além de mediadores plasmáticos. Os mediadores liberados após uma agressão ficam armazenados em células como os mastócitos, presentes em todos os tecidos conjuntivos, ou em terminações nervosas sensitivas, ou são produzidos por outras células como o endotélio, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células parenquimatosas ou do estroma. Esses mediadores provocam vasodilatação e extravasamento de líquidos, promovem adesão endotelial e maior recrutamento de células inflamatórias (NATHAN, 2002; PEREIRA, 2006).

A vasodilatação favorece o aumento do fluxo sanguíneo local, diminuição do fluxo local, e conseqüentemente, extravasamento de líquido rico em proteínas para o espaço intersticial (exsudato). A perda de líquidos leva a uma hemoconcentração local, deixando o sangue mais viscoso e lento (estase). Quando a estase se desenvolve, ocorre uma orientação periférica de leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular, processo denominado marginação leucocitária (PEREIRA, 2006; CHARO & RANSOHOFF, 2006; CHARO & TAUBMAN, 2004).

A marginação leucocitária representa o primeiro evento das alterações celulares da resposta inflamatória. Os mediadores inflamatórios imediatos promovem ativação endotelial, aumentando a expressão de suas moléculas de adesão. Esse processo favorece a formação de fileiras de leucócitos que rolam lentamente ao longo do endotélio vascular, processo denominado rolagem, e em seguida aderem transitoriamente ao endotélio. Ativados por quimiocinas, os leucócitos aumentam a avidéz de suas ligações às moléculas de adesão do endotélio (aderência) e em seguida passam entre as células endoteliais



adjacentes (transmigração ou diapedese). Uma vez no interstício, os leucócitos migram em direção ao estímulo lesivo por quimiotaxia.

Na maioria das inflamações, as primeiras células a deixarem os vasos são os polimorfonucleares. Eles constituem as células predominantes do exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo a família das interleucinas (IL), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon (IFN) são extensivamente produzidos por vários tipos celulares do sítio inflamatório, ligando e ativando receptores acoplados à proteína G nas células imunes (CHARO & RANSOHOFF, 2006; CHARO & TAUBMAN, 2004). A ativação destes receptores desencadeia uma cascata de sinais intracelulares que alteram a morfologia e migração celular. Em seguida, monócitos migram para o sítio inflamatório por quimiotaxia, onde se diferenciam em células dendríticas e macrófagos. Os monócitos começam a migrar dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a diapedese, estes se acumulam rapidamente e então, os macrófagos passam a ser as células predominantes após 48 horas (VISSER et al., 2006; PEREIRA, 2006; KUMAR et al., 2008).

Os macrófagos irão produzir uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas em vários tipos celulares incluindo células endoteliais (ECs), células epiteliais e células de origem mesenquimal (VISSER et al., 2006). Os macrófagos liberam substâncias biologicamente ativas que resultam na remodelação tecidual e recrutamento de leucócitos adicionais como os linfócitos B e T citotóxicos, antígeno-específicos, que irão ampliar a resposta inflamatória (VISSER et al., 2006). Dentre estas substâncias podem-se citar as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, proteases, citocinas, quimiocinas, fatores de coagulação e metabólitos do ácido araquidônico (responsáveis pelo aumento do recrutamento de leucócitos) além de fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), citocinas fibrinogênicas e fatores da angiogênese (responsáveis pela ativação do reparo tecidual) (KUMAR et al., 2008).

Esta resposta inflamatória é regulada por um balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios que coexistem no sítio lesivo. A passagem de uma potente

resposta inflamatória para o processo de reparo é um ponto crítico promovido por sinais anti-inflamatórios locais, os quais são redundantes, rápidos e reversíveis (TRACEY, 2002). Sempre que moléculas pró-inflamatórias excederem às anti-inflamatórias, a inflamação torna-se exacerbada. Este desequilíbrio resulta no aumento da produção de proteases, proteoglicanos, mediadores lipídicos que, concomitantemente, reforçam o processo (MROWIETZ & BOEHNCKE, 2006). Como a inflamação envolve a migração e o extravasamento de células imunes através da microvasculação, um importante papel é atribuído ao endotélio. De fato, os tecidos inflamados são acompanhados de migração celular e aumento da angiogênese.

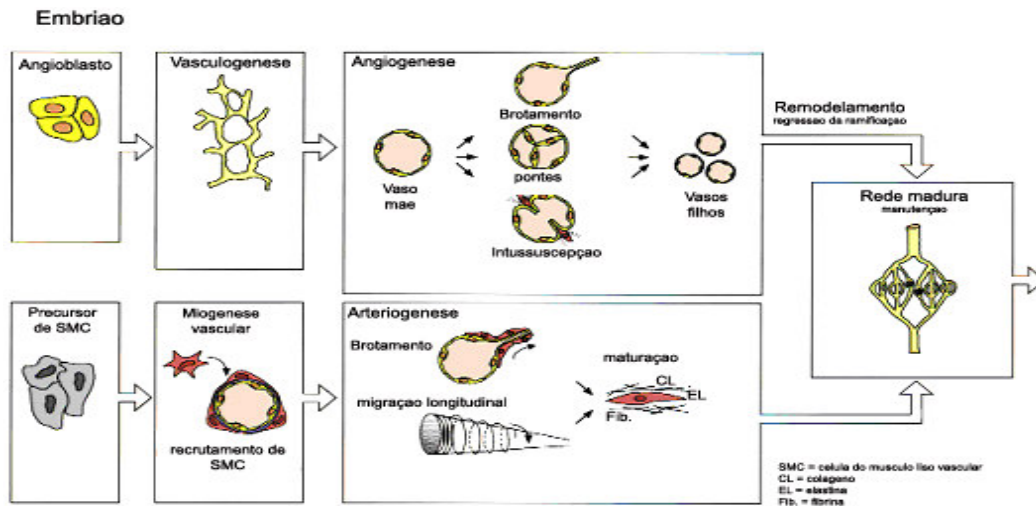
## **1.2 – Angiogênese**

A angiogênese é definida como brotamento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes resultando em uma nova rede de capilares. Essa rede capilar consiste de tubos de células endoteliais carentes das estruturas adicionais da parede incluindo as células de músculo liso ou das células e estruturas que estabilizam a adventícia (HEIL et al., 2006). É um termo de origem grega (“aggeîon” = vaso capilar, vaso; e “gênesis”= formação, constituição) que foi utilizado primeiramente por Arthur Tremain Hertig, em 1935, para descrever a neoformação de vasos sanguíneos em placentas de macacas (AUSPRUNK & FOLKMAN, 1977). Posteriormente, o termo foi utilizado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vasos pré-existentes. Atualmente, tem sido utilizado para denotar o processo de crescimento e remodelação de uma vasculatura primitiva em um complexo vascular (CARMALIET, 2000).

Os vasos sanguíneos são formados por células endoteliais que estão em contato direto com o fluxo sanguíneo. Sob as células endoteliais encontram-se os pericitos, as células musculares lisas, a membrana basal e a matriz extracelular. A função, a composição e o fenótipo dos vasos sanguíneos variam de acordo com sua localização, com a estrutura vascular, os constituintes celulares, a membrana basal e a matriz extracelular (RAJOTTE et al., 1998).

Nos primeiros estágios, o embrião se desenvolve na ausência de vascularização, recebendo sua nutrição por difusão. De maneira ordenada e seqüencial, contudo, o embrião rapidamente se transforma em um organismo altamente vascular, e sua sobrevivência depende de uma rede complexa de plexos capilares e vasos sanguíneos. Os eventos iniciais no crescimento vascular os quais células endoteliais precursoras (angioblastos) migram para locais distintos, diferenciam e reúnem-se em cordões endoteliais sólidos é denominado vasculogênese (CONWAY et al., 2001). Esse modo de crescimento é predominante durante a embriogênese, embora ocorra também em organismo adulto. Tem sido demonstrado que células endoteliais precursoras contribuem para a formação de novos vasos em tecidos isquêmicos, nos ovários durante a ovulação e formação do corpo lúteo, ou durante a cicatrização de feridas e o crescimento de placas ateroscleróticas (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005). O crescimento subsequente, expansão e remodelamento desses vasos primitivos em uma rede vascular madura são referidos como angiogênese (CONWAY et al., 2001). Angiogênese é a formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Desse modo, a angiogênese é distinta da vasculogênese (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005). Finalmente, mais modificações funcionais das grandes artérias ocorrem durante a arteriogênese como a adição de uma grossa camada muscular concomitante com a aquisição de propriedades viscoelásticas e vasomotoras (CONWAY et al., 2001) (Figura 1).

No indivíduo adulto, a principal forma de formação de novos vasos é a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) em resposta direta à demanda tecidual (RISSAU, 1997).



**Figura 1:** Desenvolvimento de vasos no embrião, células precursoras endoteliais (angioblastos) formam uma rede vascular primitiva (vasculogênese), que expande e remodela (angiogênese). Células de músculo liso (SMC) cobrem as células endoteliais durante a miogênese vascular e estabilizam os vasos durante a arteriogênese (adaptado de CARMELIET, 2000).

Em indivíduos adultos, sob condições normais, as células endoteliais permanecem em estado de quiescência (AREMBERG et al., 1997). Porém, quando estimuladas adequadamente, elas se tornam ativas e iniciam uma cascata de eventos que culminam na neoformação vascular. O estado quiescente das células endoteliais está associado a um equilíbrio entre substâncias endógenas pró e anti-angiogênicas. Esse equilíbrio pode ser rompido por fatores químicos ou físicos como injúria tissular, hipóxia, alteração na liberação de citocinas e fatores de crescimento, e alterações do fluxo sanguíneo e do formato celular, desencadeando atividade angiogênica ou anti-angiogênica (INGBER et al., 1986; D'AMORE & THOMPSON, 1987). A regulação da proliferação e migração celular também tem sido descrita pela interação das células endoteliais com os pericitos e/ou células musculares lisas constituintes dos vasos (D'AMORE & THOMPSON, 1987; CHANG & WERB, 2001; FOLKMAN, 1995). As células endoteliais podem, ainda, interagir com os componentes da matriz extracelular como o colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos, alterando a expressão fenotípica de capilares (MADRI & WILLIAMS, 1983). Os componentes da matriz extracelular também podem se ligar e estocar fatores de crescimento, o que dificulta a utilização destes pelas células endoteliais (FOLKMAN et al., 1988; DAVIDSON & BENN, 1996).

### 1.2.1 - Etapas e mecanismos de regulação da angiogênese

A angiogênese tem início a partir da dilatação de vasos pré-existentes, principalmente, vênulas ou capilares. Quando se tem o estímulo angiogênico, as células endoteliais são ativadas formando projeções em sua superfície, ocorre aumento no número de organelas intracelulares e na produção de enzimas proteolíticas que fragmentam a membrana basal e a matriz extracelular, possibilitando a migração e proliferação das células endoteliais. As etapas seguintes são: formação do lúmen, conexão com outro vaso e formação da membrana basal e, posteriormente, tem-se a migração dos pericitos (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005; FOLKMAN & BREM, 1992; AUSPRUNK & FOLKMAN, 1977).

Os mecanismos de regulação do processo angiogênico envolvem uma seqüência de eventos que são influenciados por sinais biológicos como hipóxia, citocinas e fatores de crescimento (OTROCK et al., 2007; FOLKMAN & GREENSPAN, 1975).

Os fatores de crescimento fazem parte de uma subclasse de citocinas que estimulam, especificamente, a migração e proliferação celular (GREENHALGH, 1996). Estes fatores podem agir estimulando a migração e/ou proliferação das células endoteliais, ou estimulando células do hospedeiro a secretar fatores de crescimento quimiotáticos, ou promovendo a liberação de mitógenos endoteliais estocados na matriz extracelular ou em depósitos intracelulares (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987).

Desse modo, a coordenação da angiogênese é acompanhada por uma variedade de ativadores e inibidores que sequencialmente sincronizam uma complexa série de eventos (CARMELIET & JAIN, 2000). Esse processo requer a ativação de muitos receptores e numerosos ligantes, incluindo o fator de crescimento placentário (PIGF), fator de crescimento de fibroblasto ácido e básico (aFGF e bFGF, respectivamente), angiopoietinas (principalmente Ang-1 e 2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), e fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), dentre muitos outros (YANCOPOULOS et al., 2000; PRESTA et al., 2005; MIYAZONO et al., 1991; OHNISHI & DAIKUHARA, 2003;

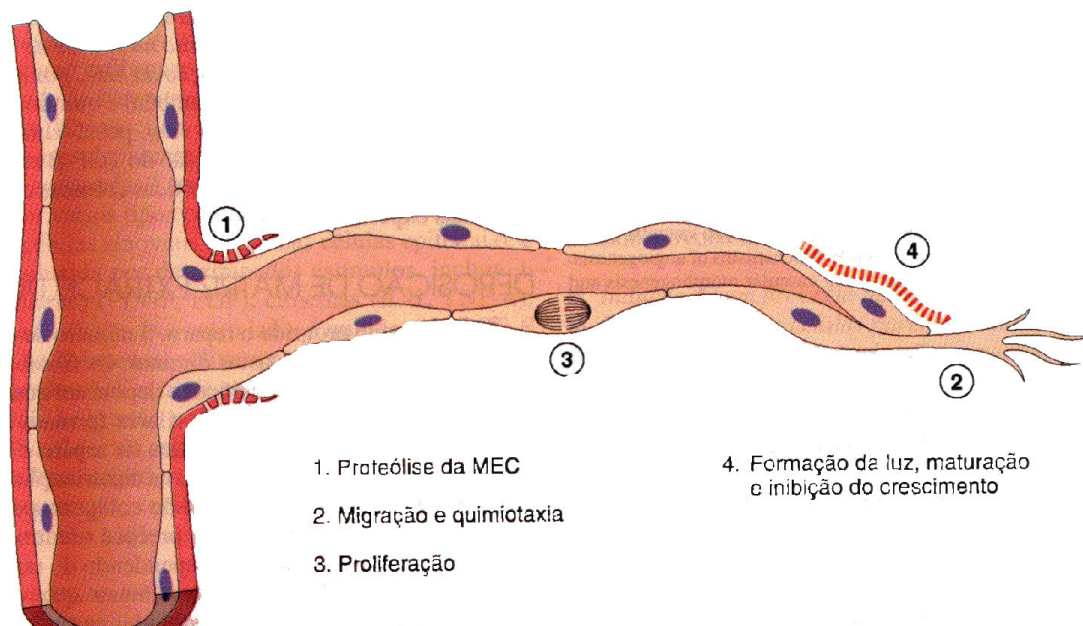
LUTTUN et al., 2002). Apesar do grande número de fatores que desempenha um papel na angiogênese, a sinalização do VEGF nas células endoteliais representa o passo limitante durante o processo (FERRARA et al., 2003). O VEGF atua pela atração com seus receptores tirosina quinase VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais. Embora o VEGF ligue aos dois receptores, parece que muitas de suas funções são mediadas pelo VEGFR-2, assim induzindo migração, sobrevivência e proliferação das células endoteliais pré-existentes e a formação de uma nova vasculatura (WHEELER-JONES et al., 1997; GERBER et al., 1998a e b) . Além disso, o VEGF é também o principal fator envolvido na mobilização de células endoteliais progenitoras (EPCs) da medula óssea para a circulação periférica e sítios angiogênicos, onde elas diferenciam e integram à nova vasculatura (ASAHARA et al., 1999; COSTA et al., 2004).

Os fatores angiogênicos são aumentados por vários estímulos incluindo hormônios esteróides, aumento da pressão arterial, lesões ou estresse. A ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é uma enzima induzível, que pode ser responsável pelo aumento de prostaglandinas durante a inflamação. Esta enzima também contribui para a angiogênese por regular a produção de VEGF, indicando, portanto, que a inflamação pode ser um dos moduladores da angiogênese (COSTA et al., 2007).

A primeira etapa da angiogênese está associada com a alteração das interações adesivas entre células endoteliais adjacentes e células do músculo liso vascular. Nesta fase, na presença de um estímulo angiogênico, as células endoteliais tornam-se ativadas e a seguir ocorre vasodilatação. Esta se deve à estimulação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que promove ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas células endoteliais, aumentando os níveis de óxido nítrico (NO) e a síntese de GMPc. O GMPc provoca relaxamento das células musculares lisas da parede do vaso. O VEGF atua, também, aumentando a permeabilidade vascular através da formação de organelas vesículo-vacuolares nas células endoteliais, o que permite o extravasamento de proteínas proteolíticas plasmáticas para o meio extravascular. Tais enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular permitindo a penetração endotelial no espaço perivascular (DISTLER et al., 2003).

Para que a migração das células endoteliais ocorra, é necessário o afastamento dos pericitos ou células musculares lisas que envolvem a camada endotelial, a degradação proteolítica da membrana basal do vaso original e a remodelação do estroma perivascular. Dentre as substâncias responsáveis por estes processos, tem-se a angiopoietina-2 e proteases (ativador de plasminogênio, quinases e metaloproteinases). O processo de invasão e migração das células endoteliais requer uma atividade cooperativa do sistema ativador de plasminogênio (PA) e das metaloproteinases 8 e 9 (MOSES, 1997). As uroquinonas ativadoras de plasminogênio (uPAs) e os ativadores de plasminogênio teciduais (tPAs) são proteases com serina que convertem o plasminogênio em plasmina. A plasmina degrada vários componentes da matriz extracelular, incluindo fibrina, fibronectina, laminina e proteoglicanos; além de ativar várias metaloproteinases (MIGNATTI & RIFKIN, 1996; MURPHY et al., 1999)

O próximo passo é a proliferação destas células para a formação do lúmen tubular. A partir daí começam a aparecer ramificações, com eventual conexão entre os brotos, e uma rede de novos tubos é formada. A última fase consiste na maturação e estabilização do vaso, na qual, novos componentes da matriz extracelular são produzidos e depositados sob a forma de nova membrana basal. A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é alcançada após a migração de células mesenquimais para a proximidade dos neovasos, e a posterior diferenciação deste tipo celular em pericitos ou células musculares lisas, e pela regeneração da matriz extracelular e membrana basal (HIRSCHI & D'AMORE, 1997; JAIN, 2003) (Figura 2).



**Figura 2:** Etapas da angiogênese. MEC – Matriz extracelular. Figura retirada e adaptada de COTRAN et al. 2000, em Robbins Patologia estrutural e funcional, pág 93 (Modificado de Motamed K, Sage EH: Regulation of vascular morphogenesis by SPARC. *Kidney Int* 51:1383, 1997).

A angiogênese está presente em vários processos fisiológicos e patológicos do organismo (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000). É um processo natural e necessário tanto no desenvolvimento embrionário, como na regeneração do endométrio e ainda, na cicatrização de feridas. Em várias condições fisiopatológicas tais como, estenose de vasos, isquemia e tecidos transplantados, a estimulação do crescimento vascular propiciando um suprimento sanguíneo adequado é uma condição fundamental para a sobrevivência e função tecidual. Em outras condições patológicas como em neoplasias, retinopatia diabética, arterosclerose, etc., a angiogênese é um fator complicante e contribui para a manutenção e agravamento destas patologias (FOLKMAN & SHING, 1992; FOLKMAN, 1995).



### 1.3 - Angiogênese e inflamação

Durante uma resposta inflamatória, se há a permanência do estímulo lesivo, ocorre a cronificação do processo inflamatório, que por sua vez é caracterizado por um aumento de macrófagos no local, proliferação de fibroblastos o que aumenta a síntese de matriz, a angiogênese e a lesão tecidual. Esse aumento na angiogênese propicia um aumento do infiltrado inflamatório, o qual libera substâncias pró-angiogênicas, e assim, cria-se um ciclo vicioso (JACKSON et al., 1997).

A inflamação e a angiogênese são, assim, dois processos que se juntam. A hipóxia é um estímulo comum aos dois processos, resultando na acumulação de macrófagos e outras células imunes, bem como, no aumento da produção de fatores de crescimento (MURDOCK et al., 2005; CARMELIET, 2005; CARMELIET & JAIN, 2000).

A angiogênese sustenta a inflamação através do fornecimento de oxigênio e nutrientes para as necessidades metabólicas das células presentes no sítio inflamatório. Isto é realizado, em primeiro lugar, pela produção de NO, um agente inflamatório produzido pela ativação da NO sintase induzível (iNOS) em células inflamatórias. O NO estimula a vasodilatação e o aumento da permeabilidade, uma característica necessária para o extravasamento celular (CHARO & TAUBMAN, 2004). Mas muitas outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas durante a inflamação são potentes ativadores das células endoteliais vizinhas, aumentando nestas, a expressão de moléculas de adesão importantes para o processo de rolagem, ativação, adesão e transmigração das células inflamatórias sanguíneas para a área de lesão (LEY, 2001). Os mediadores inflamatórios produzidos pelas células imunes atuam sobre fibroblastos e células endoteliais a liberar fatores angiogênicos, favorecendo estímulo indireto para que a angiogênese ocorra. As células inflamatórias podem, ainda, elas mesmas liberar diretamente fatores angiogênicos como VEGF, angiopoietina, b-FGF, HGF, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dentre muitos outros, os quais irão exercer efeitos mitogênicos e migratórios sobre o endotélio (BENELLI et al., 2006; NALDINI & CARRARO, 2005).

Existem muitas doenças inflamatórias crônicas com distintas etiopatogenias, que levam a mecanismos moleculares idênticos e que promovem a inflamação e a angiogênese ao mesmo tempo, incluindo psoríase, artrite reumatóide, doença de Crohn's, diabetes e câncer. Este conhecimento emergente levou a busca por agentes terapêuticos que agissem diretamente sobre ambos os processos (angiogênese e inflamação). Assim, agentes que atuassem sobre a formação de novos vasos sanguíneos diminuiriam o influxo de células inflamatórias, reduziriam a produção de mediadores inflamatórios e proteolíticos, e preveniriam o suprimento de nutrientes para um processo inflamatório ativo. Enquanto que, agentes que atuassem sobre a resposta inflamatória iriam afetar negativamente a formação de novos vasos sanguíneos (COSTA et al., 2007).

#### **1.4 – Reparo tecidual**

A capacidade de reparar danos causados por agentes tóxicos ou inflamatórios é crítica para a sobrevivência de um organismo. A resposta inflamatória não serve somente para eliminar estes agentes lesivos, mas também para estimular os processos de reparo (KUMAR et al., 2008).

Reparo refere-se a um processo complexo e dinâmico que resulta na restauração da arquitetura tecidual e da função após a lesão (LAZARUS et al., 1994). Existem quatro respostas básicas que podem ocorrer após uma lesão: 1) a regeneração, um processo que ocorre quando há perda da estrutura e função, mas o organismo tem capacidade de restabelecer a estrutura do tecido exatamente ao que era antes da lesão; 2) cicatrização deficiente, quando há deposição insuficiente de tecido conectivo e matriz enfraquecida; 3) a cicatrização excessiva, quando ocorre deposição excessiva de tecido conectivo que resulta em alteração da estrutura tecidual e, assim, perda da função (como as fibroses e aderências); 4) o reparo normal, quando há restabelecimento do equilíbrio entre a formação da cicatriz e o remodelamento da cicatriz (VAN ZUIJLEN et al., 2002; BOCK & MROWIETZ, 2002; RAHBAN & GARNER, 2003; KRUMMEL et al., 1987).

A cascata de cicatrização começa imediatamente após a lesão, de forma eficiente e organizada, caracterizada por quatro fases distintas, mas sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. A hemostasia é ativada pelo contato de componentes do sangue e das plaquetas com o colágeno, ativando assim, a cascata de coagulação. As plaquetas também liberam citocinas e fatores de crescimento como PDGF e TGF- $\beta$  que promovem quimiotaxia de leucócitos, migração e proliferação celular, e ativação de mais células inflamatórias. A inflamação, conforme descrita anteriormente apresenta uma fase inicial caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, alterações vasculares e pelo infiltrado predominante de neutrófilos nas primeiras 24 horas e por uma fase tardia em que após aproximadamente 48 horas do início da lesão ocorre predominância de macrófagos no sítio lesivo. A presença de macrófagos é um sinal que a fase inflamatória está próxima de acabar e que a fase proliferativa está iniciando (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

Os fibroblastos são as células predominantes na fase proliferativa. Esta célula de origem mesenquimal é responsável por produzir a nova matriz necessária para restaurar a estrutura e função do tecido lesado. A liberação de interleucinas, FGF, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  por plaquetas e células inflamatórias (macrófagos e linfócitos T) é muito importante para a fase proliferativa, no entanto, o TGF- $\beta$  tem um papel central nesta fase pois é considerado o principal regulador das funções dos fibroblastos (ROBERTS & SPORN, 1993). O TGF- $\beta$  aumenta a transcrição de genes para colágeno, proteoglicanos e fibronectina e assim, aumenta a produção de proteínas de matriz. Ao mesmo tempo o TGF- $\beta$  diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz e também estimula o inibidor de protease, inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP) (HALL et al., 2003).

A matriz extracelular, inicialmente, é composta, principalmente, de fibrina e fibronectina, posteriormente os fibroblastos sintetizam glicosaminoglicanos, proteoglicanos, colágeno e outras proteínas formando o tecido de granulação (REGAN et al., 1991; EHRLICH & KRUMMEL, 1996; CLARK, 2001). Após o pico da atividade proliferativa os fibroblastos se diferenciam em um fenótipo contrátil, o miofibroblasto (TOMASEK et al., 2002; HINZ, 2007) que continuam proliferando e sintetizando colágeno (CLARK, 2001). O colágeno depositado

inicialmente é mais fino que o colágeno de um tecido sem lesão e está orientado paralelamente à pele. Com o passar do tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais grosso é depositado e organizado paralelamente às linhas de tensão. Estas alterações são acompanhadas também com um aumento da força tensora da ferida indicando uma correlação positiva com a espessura/orientação do colágeno e força tensora e determinam a fase de remodelamento (WITTE & BARBUL, 1997; DIEGELMANN, 2003).

À medida que o tecido de granulação preenche a área lesada, o número de células inflamatórias diminui e os fibroblastos e as células endoteliais continuam a sintetizar fatores de crescimento da matriz extracelular. Os macrófagos desempenham um papel central neste processo. Estas células englobam células apoptóticas de forma rápida e eficiente, intermedeiam a morte de células do estroma, parênquima e células imunológicas, engajando-se no programa de morte celular que resulta em apoptose (DESMOULIERE et al., 1995; DUFFIELD, 2003). Devido à alta atividade metabólica no sítio lesivo, há um aumento da demanda por oxigênio e nutrientes. Fatores locais no microambiente da lesão como pH reduzido, redução da tensão de oxigênio e aumento de lactato, atuam sobre as células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais vasculares, promovendo a liberação de fatores como VEGF, bFGF e TGF- $\beta$  necessários para induzir a angiogênese (HUNT et al., 1984; LAVAN & HUNT, 1990, TONNESEN et al., 2000). A resposta angiogênica é essencial para uma reparação tecidual normal, pois além de fornecer nutrientes e células inflamatórias para o tecido lesado, os novos vasos sanguíneos facilitam a remoção do material residual e auxiliam no desenvolvimento do tecido de granulação (NISSEN et al., 1998). Em condições inflamatórias crônicas, as células endoteliais ativadas por citocinas e fatores de crescimento, recrutam ativamente células imunes da circulação para o tecido e participam da angiogênese para dar suporte à contínua demanda de oxigênio e nutrientes pelas células inflamatórias.

## 1.5 - Fibrose

Como citado até aqui, o processo de reparo tecidual segue uma série de eventos que incluem a regulação da célula, através de seu recrutamento e replicação assim como da síntese e degradação da matriz. Esses eventos são controlados por mediadores derivados das células residentes e inflamatórias bem como do sangue. Forças mecânicas as quais a lesão é submetida durante a contração da ferida também podem influenciar o processo de reparo. Além disso, é provável que haja um feedback exercido pelas moléculas sintetizadas e degradadas durante o processo de inflamação, formação do tecido de granulação, e maturação da cicatriz (MUTSAERS et al., 1997).

A fibrose pode ser definida como uma deposição excessiva de componentes da matriz que resulta em alteração da arquitetura normal do tecido e comprometimento da função tecidual. O desenvolvimento da fibrose parece seguir uma via similar àquela da cicatrização normal de feridas. Contudo, em muitos casos há uma progressão crônica, a qual resulta em deposição excessiva de componentes da matriz extracelular sem resolução. A fibrose geralmente desenvolve após uma agressão tal que leva à lesão e morte celular com consequente deposição de matriz extracelular e eventualmente levando à disfunção e morte celular (MUTSAERS et al., 1997).

Portanto, a resposta fibrótica parece ser determinada por três fatores: 1) um estímulo ou insulto contínuo, sugerindo que o processo fibrótico é um evento em curso com perda de controle homeostático da resposta; 2) síntese excessiva de colágeno e outros componentes da matriz extracelular; e 3) ausência da resolução devido à desregulação das enzimas degradativas envolvidas na remoção do tecido cicatricial. Agentes ambientais como amianto, sílica, infecções bacterianas e virais e insultos físicos, também podem estimular o desenvolvimento de fibrose em vários órgãos (MUTSAERS et al., 1997).

Apesar de apresentar diferentes etiologias e manifestações clínicas, muitas desordens fibróticas crônicas têm em comum um irritante persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, as quais estimulam a deposição

de elementos conectivos que progressivamente remodelam e alteram a arquitetura normal do tecido (WYNN, 2008).

Muitos problemas clínicos estão associados à formação excessiva de cicatriz como quelóides, cicatrizes hipertróficas, bloqueio de transmissão após lesão de nervo, esclerodermia, estenoses esofágicas, estenose uretral, cirrose hepática, aterosclerose, doença de Crohn's, cápsulas ao redor de implantes mamários e aderências (DIEGELMANN & EVANS, 2004). Portanto, compostos que exibem propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogênicas e/ou anti-fibrogênicas apresentam potencial valor terapêutico para prevenir e/ou atenuar o processo.

## **1.6 – Estatinas**

As estatinas são os fármacos mais prescritos para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana. Sua ação é proveniente da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), etapa limitante da biossíntese do colesterol. Essa inibição reduz a secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo-B) e aumenta a síntese do receptor de LDL diminuindo os seus níveis plasmáticos (ENDO, 1992).

A mevastatina (ou compactina) foi o primeiro inibidor de HMG-CoA redutase descoberto em 1976. Embora tenha sido descoberta em uma triagem de compostos antimicrobianos, logo foi confirmado que esta molécula era desprovida de propriedades antibióticas e que, em vez disso, exercia potente efeito redutor de colesterol em diversas espécies de animais como coelhos, macacos e cães (WATANABE et al., 1981; KURODA et al., 1979; TSUJITA, et al., 1979). Logo após a descoberta de compactina, um segundo HMG-CoA redutase de origem natural, inicialmente denominado mevinolina e mais tarde lovastatina, foi identificado (ALBERTS et al., 1980). Os ensaios clínicos com compactina foram interrompidos em 1980, por toxicidade em animais. Este fato gerou desconfiança sobre a segurança do uso de lovastatina em pacientes,

especialmente se aplicada como um tratamento crônico, e atrasou o início da lovastatina ensaios clínicos. No entanto, estudos de segurança de animais e estudos de curto prazo em humanos não revelaram sinais de toxicidade com a lovastatina, e os estudos clínicos de fase II em pacientes com hipercolesterolemia familiar e pacientes de alto risco sem hipercolesterolemia familiar começou em 1984. A lovastatina foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos em 1987, representando a primeira HMG-CoA redutase a entrar para o uso clínico. A introdução de novos derivados sintéticos da classe das estatinas ocorreu em 1996 e 1997, com a atorvastatina (Pfizer) e a cerivastatina (Bayer), respectivamente. No entanto, em agosto de 2001, a Bayer retirou a cerivastatina do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal, relacionados a dano severo da musculatura esquelética com alteração das células musculares, liberação de mioglobina e, freqüentemente, acompanhado de problemas renais (WIERZBICKI et al., 2003a). A maioria dos casos foi observada em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais associadas ao uso de genfibrosil, fármaco da classe dos fibratos empregados no tratamento das hipertrigliceridemias (BAKRI et al., 2003).

Sete estatinas estão atualmente disponíveis para a aplicação clínica, que podem ser classificadas, de acordo com as suas origens, em dois grupos principais. As estatinas naturais, que são de origem fúngica, incluem a lovastatina, a pravastatina e a simvastatina. Especificamente, a lovastatina é um produto natural, enquanto a sinvastatina e a pravastatina são análogos semi-sintéticos (IGEL et al., 2002). As estatinas mais recentes (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina) são compostos sintéticos (WIERZBICKI et al., 2003b). As estatinas naturais são bastante semelhantes com relação à estrutura química, embora a sinvastatina seja de aproximadamente duas vezes mais potente que a lovastatina ou a pravastatina (VEILLARD & MACH, 2002).

As estatinas diferem quanto à permeabilidade tecidual e metabolismo. Os compostos mais lipofílicos são a sinvastatina e a lovastatina enquanto a pravastatina e a rosuvastatina são os mais hidrofílicos. Todas as estatinas, exceto a atorvastatina (14 h) e a rosuvastatina (22 h) têm meia-vida plasmática curta. As estatinas apresentam diversas vias de excreção. A pravastatina é

excretada de forma significativa pelos rins, enquanto que as outras são metabolizadas pelo fígado em seus ácidos hidroxi ativos e excretadas na bile. A rosuvastatina é glicuronizada para excreção, enquanto a sinvastatina, a lovastatina e a atorvastatina são metabolizadas pela citocromo P450 3A4. A cerivastatina é metabolizada pela P450 3A4 e 2C8, e a fluvastatina é metabolizada pela 2C9 (WIERZBICKI et al., 2003b). São bem toleradas com boa margem de segurança durante a utilização prolongada. Os efeitos colaterais não são freqüentes, mas um dos mais sérios está relacionado à ação hepatotóxica, com possível aumento das enzimas aspartato e alanina transaminases. Miopatias, com evolução a rabdomiólises e insuficiência renal, são raras, mas são efeitos graves associados ao uso de estatinas. Parece que o uso concomitante de estatinas com eritromicina, ciclosporina, niacina e fibratos aumenta o risco de miopatias em 10-30% dos pacientes (PRUEKSARITANONT et al., 2005 e 2003; WIERZBICKI et al., 2003a e b).

#### 1.6.1 – Mecanismo de ação das estatinas

A inibição da HMG-CoA mediada pelas estatinas é devida à sua similaridade estrutural ao substrato da enzima. Todas as estatinas possuem uma molécula semelhante à HMG, em alguns compostos, ela aparece na forma de lactona inativa, a qual é enzimaticamente hidrolisada *in vivo* para a forma ativa do ácido hidroxi (CORSINI et al., 1995). Esta molécula ocupa metade do sítio de ligação ativo da enzima HMG-Coa redutase, criando um grande número de ligações de hidrogênio emparelhadas resultando em uma ligação forte, porém reversível (ISTVAN & DEISENHOFER, 2001).

Como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, as estatinas causam a diminuição do mevalonato (metabólito da síntese do colesterol) e conseqüentemente de outros compostos isoprenóides como o farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP). A redução hepática do colesterol ativa a família dos fatores de transcrição denominados Proteínas ligantes do elemento regulador de esterol (SREBPs), causando um aumento na transcrição do gene que codifica o receptor de LDL hepático. O



aumento no número de receptores para LDL causa aumento no *clearance* de LDL circulante, este é o principal mecanismo pelo qual as estatinas reduzem o colesterol LDL do plasma (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; HORTON & SHIMOMURA, 1999). Por outro lado, a inibição da síntese do mevalonato também reduz a formação de FPP e GGPP. Estas proteínas atuam na isoprenilação pós-tradução de proteínas, como os membros da família da GTPase, Ras, RhoA e Rac. A isoprenilação é um passo fundamental para a associação destas pequenas proteínas à membrana plasmática e é essencial para que estas apresentem atividade biológica (LIAO, 2002; LANDSBERGER et al., 2005). A geranylgeranilação é de particular interesse, pois afeta a ativação dependente de proteína G e várias vias de sinalização celular. A redução da isoprenilação é o mecanismo molecular mais provável para os efeitos independentes da redução de lipídeos das estatinas, coletivamente chamados de efeitos pleiotróficos (TAKEMOTO & LIAO, 2001).

### **1.7 - Angiogênese, Inflamação, Fibrose e Estatinas**

As estatinas são muito eficientes no tratamento da hipercolesterolemia e em desordens cardiovasculares. Nestas condições, estes compostos exercem possíveis efeitos protetores na bioatividade do óxido nítrico produzido pelas células endoteliais e na estabilização de placas ateroscleróticas (VAUGHAN et al. 2000; KOH, 2000).

O efeito benéfico das estatinas pode estender além dos mecanismos de redução do colesterol. Investigações recentes têm mostrado diversos efeitos importantes das estatinas, como ação antineoplásica (JAKOBISIAK & GOLAB, 2003), inibição da reabsorção óssea (STAAL et al., 2003), aumento da disponibilidade de óxido nítrico endotelial (KALINOWSKI et al., 2002), relaxamento do músculo liso vascular (MUKAI et al., 2003), atenuação da hipertrofia do miócito cardíaco (NISHIKIMI et al., 2002), inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos (VINCENT et al., 2002), diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6, liberada pelo tecido adiposo (LIAO & LAUFS, 2005; VAN HARMELEN et al, 2003).

Dentre os efeitos já catalogados das estatinas destacam-se suas atividades na neoformação vascular (angiogênese) os quais são amplamente contraditórios. Vários estudos clínicos mostram efeitos endotélio-dependente das estatinas (PACKARD, 1998; RAUCH et al., 2000; SACKS et al., 1996; SCHWARTZ et al., 2001). Tem sido reportado que as estatinas apresentam atividades pró e anti-angiogênicas, o chamado efeito bifásico. Parece que baixas concentrações de estatinas induzem efeitos pró-angiogênicos através da ativação da fosfatidilinositol quinase-3/ serina/treonina quinase (PI3 kinase/Akt), sinalização que leva a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e produção NO. Em contraste, altas concentrações de estatinas inibem a síntese do mevalonato, levando à diminuição na prenilação da proteína, inibição do crescimento celular ou apoptose (II & LOSORDO, 2007).

Existem relatos de que as estatinas reduzem a migração e proliferação de células endoteliais (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005) e potenciam o efeito anti-tumoral do TNF- $\alpha$  (NÜBEL et al. 2004). Outros estudos têm mostrado efeitos pró-angiogênicos destes compostos (KUREISHI et al. 2000; WEIS, et al., 2002). Estes resultados discrepantes são atribuídos a fatores como, tipos celulares, doses e regimes de tratamento e ensaios utilizados. Weis e colaboradores (2002) mostraram que as atividades pró- ou anti-angiogênica *in vivo* e *in vitro* dependem das concentrações e compostos utilizados. Assim, estes autores sugeriram que concentrações nanomolares de estatinas estimulam a angiogênese, efeito considerado benéfico para o tratamento de doenças cardiovasculares (isquemias), e que a atividade anti-angiogênica é observada em concentrações micromolares de estatinas, o que pode ser de especial significância na terapia do câncer e doenças inflamatórias. Esses efeitos são causados pela inibição da proliferação e migração e indução de apoptose nas células endoteliais (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005).

Tem sido proposto, ainda, que as estatinas apresentam efeito anti-inflamatório. Estudos recentes sugerem que este efeito é devido à capacidade de reduzirem o recrutamento de células inflamatórias em placas ateroscleróticas (VAUGHAN et al., 2000). Os mecanismos envolvidos estão relacionados à inibição da adesão de moléculas, tais como moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), as quais estão ligadas ao recrutamento de

células inflamatórias. Adicionalmente, as estatinas atenuam a expressão de P-selectinas e a adesão de leucócitos pelo aumento da produção de óxido nítrico endotelial, também inibem a expressão da quimiocina proteína quimiotática para monócito - 1 (CCL2/MCP-1/JE) e interferem na expressão de citocinas como as interleucinas 1 e 6. Estes efeitos independem da biossíntese celular de colesterol (ALEGRET & SILVESTRE, 2007).

Alguns estudos também têm mostrado que as estatinas apresentam efeito inibidor da fibrose. Em um modelo de nefropatia em ratos, a lovastatina reduziu a expressão do fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) nas células mesangiais (KIM et al., 2000). As estatinas também causam potente redução dos níveis de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) em cultura de fibroblastos de vários tecidos (GOPPELT-STRUEBE et al., 2001; HEUSINGER-RIBEIRO et al., 2004; WATTS et al., 2005) e na produção de colágeno (LOUNEVA et al., 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* também têm mostrado que as estatinas podem ser eficazes em prevenir aderências e fibrose, por serem capazes de estimular a atividade fibrinolítica nas células mesoteliais tanto em condições normais como inflamatórias. Estes efeitos estão associados à inibição dos intermediários isoprenóides da via de biossíntese do colesterol, como FPP e GGPP, que regulam as modificações postranlacionais de várias proteínas, incluindo pequenas proteínas GTPases-ligantes como Rho. A inibição de Rho tem sido implicada na modificação da transdução de sinal e regulação de vários processos celulares como crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (AARONS, et al., 2007; RUPÉREZ, et al., 2007; YILMAZ et al., 2009; HASLINGER et al., 2002 e 2003).

Além dos efeitos acima mencionados, as estatinas modulam a expressão das enzimas sintases do óxido nítrico e sua produção. O efeito das estatinas na expressão da NOS foi demonstrado pela primeira vez por Laufs e colaboradores, em 1997, em que as estatinas podem prevenir a inibição da eNOS desencadeada pela hipóxia em células endoteliais, levando assim, a aumento na produção de NO por estas células. As estatinas também podem inibir a síntese de Rho quinases, proteínas que regulam negativamente a expressão de eNOS, através da inibição da síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato, como GGPP (LAUFS & LIAO, 2000; KUREISHI et al., 2000). As estatinas também podem aumentar a produção de

NO por diminuir a expressão celular de caveolina-1, a qual atua como um inibidor da ativação de eNOS por formar um heterocomplexo com esta enzima (FERON et al., 2001). O interessante é que o efeito inibidor na abundância de caveolina-1 foi observado em baixas concentrações (0,01  $\mu$ M) enquanto que alterações na expressão da eNOS só foram observadas em altas doses da atorvastatina (10  $\mu$ M) (FERON et al., 2001). A eNOS também é regulada por uma serina-treonina quinase Akt. A ativação de Akt aumenta a atividade da eNOS. As estatinas ativam Akt e assim aumentam a produção de óxido nítrico (KUREISHI et al., 2000). As estatinas não apenas aumentam a produção de NO nas células endoteliais como também podem aumentar a forma induzida da óxido nítrico sintase em células do músculo liso vascular (MUNIYAPPA et al., 2000). Embora mais atenção tenha sido dada à eNOS, o efeito das estatinas na expressão iNOS e o entendimento de seus mecanismos de ação ainda são controversos e parecem depender dos tipos de células. Em astrócitos, micróglia e macrófagos, a lovastatina apresentou bloqueio na indução de iNOS por lipopolissacarídeos (LPS) através da inibição da farnesilação (intermediário da via do mevalonato) (PAHAN et al., 1997). Por outro lado, estudos demonstraram que as estatinas podem aumentar a expressão de iNOS através das pequenas proteínas G da família Rho em células musculares lisas vasculares (CHEN et al., 2000; MUNIYAPPA et al., 2000), células epiteliais das vias aéreas (KREISELMEIER et al., 2003; HAUSDING et al., 2000), fibroblastos (HAUSDING et al., 2000) e miócitos cardíacos (IKEDA et al., 2001).

Apesar da angiogênese, inflamação e fibrose serem processos que ocorrem concomitante e sinergicamente na grande maioria das doenças inflamatórias crônicas, os estudos com estatinas tem avaliado estes processos separadamente. Além do mais, existem discrepâncias quanto aos seus efeitos que têm sido atribuídas às variações dos parâmetros de avaliação que incluem: doses, tipos celulares, regimes de tratamento e ensaios utilizados.

## 1.8 – Modelo de implante de esponjas

A implantação cirúrgica de matrizes sintéticas no espaço subcutâneo e na cavidade abdominal de roedores tem possibilitado o estudo de vários processos associados ao reparo tecidual. Este modelo de implantação subcutânea de matrizes esponjosas em animais foi descrito inicialmente por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade e colaboradores, em 1987. Neste estudo, esponjas de poliéster canuladas centralmente com tubos de polietileno eram utilizadas como matriz para o crescimento dos vasos sanguíneos e a avaliação da neovascularização era feita utilizando-se a técnica do *clearance* do xenônio radioativo ( $^{133}\text{Xe}$ ) aplicado localmente. O modelo de implantes também já foi utilizado para alojar células tumorais para o estudo da angiogênese tumoral (ANDRADE et al. 1992). A implantação da matriz esponjosa na cavidade abdominal foi realizada por Mendes e colaboradores (2007) para avaliação da resposta inflamatória, angiogênica e formação de aderências intraperitoneais. Este estudo também comparou a intensidade da resposta quando o mesmo tipo de implante foi colocado em dois compartimentos anatômicos distintos. Os resultados mostraram que a intensidade da resposta angiogênica e inflamatória era maior nos implantes da cavidade abdominal.

A matriz implantada induz uma reação inflamatória tipo corpo estranho, com a formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, novos vasos sanguíneos e matriz extracelular, sendo envolvido por uma cápsula fibrosa (MENDES, et al., 2007, GRINDLAY & WAUGH, 1951). A utilização de implantes de esponjas permite o estudo do infiltrado inflamatório, da angiogênese e da deposição da matriz extracelular; permite também a análise bioquímica dos fluidos coletados, bem como o efeito de drogas sobre o processo (MENDES, et al., 2007 e 2009; BAILEY, 1988; ANDRADE et al., 1997).

Esses modelos de implantes têm sido utilizados por serem facilmente reprodutíveis e possibilitarem objetividade na avaliação da angiogênese, inflamação e fibrose, bem como o monitoramento contínuo destes processos,

além de permitir a investigação de várias características morfofuncionais tanto em condições normais como em patológicas.

Apesar de vários trabalhos mencionados evidenciarem o efeito das estatinas na modulação da angiogênese, inflamação e fibrose, nenhum estudo avaliou estes processos concomitantemente no mesmo modelo em sítios anatômicos distintos. Sendo assim, este trabalho teve como foco principal, investigar os efeitos de duas estatinas (atorvastatina e fluvastatina) sobre estes componentes do tecido fibrovascular induzido pela implantação cirúrgica de matriz sintética no espaço subcutâneo e abdominal.

## **OBJETIVOS**

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos da atorvastatina e fluvastatina na angiogênese inflamatória induzida por implantes de esponja alojados no espaço subcutâneo e cavidade abdominal.

### **2.2 – Objetivos específicos**

- Estabelecer regimes de tratamentos que apresentem eficácia na modulação da angiogênese inflamatória;
- Avaliar através de parâmetros bioquímicos o efeito destas estatinas nos processos inflamatório e angiogênico do tecido fibrovascular;
- Determinar a influência destes compostos na produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas pró-angiogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e MCP-1);
- Avaliar histologicamente a influência destes compostos nos componentes celulares do tecido fibrovascular induzido por implantes de esponjas.



# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

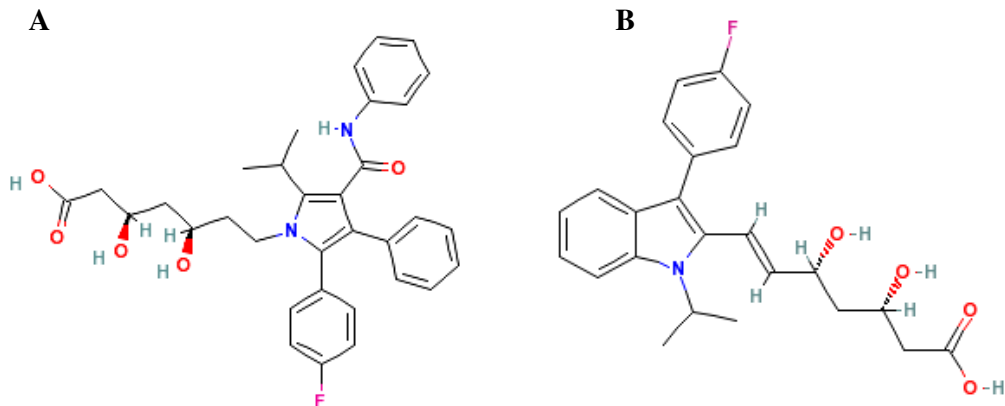
#### 3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, sadios, 8-10 semanas; 30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais. Protocolo nº 279/08.

#### 3.2 – Drogas

Foram utilizadas as estatinas: Atorvastatina (Liptor - Pfizer) (Figura 3A) e a Fluvastatina (Lescol – Novartis) (Figura 3B) como inibidoras da HMG-CoA redutase, para avaliação de seus efeitos anti-angiogênicos, anti-inflamatórios e anti-fibrogênico no modelo de implante de esponja subcutâneo e abdominal.



**Figura 3:** **A** - Molécula da Atorvastatina Cálcio Triidratada (Pfizer), Fórmula:  $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ . **B** - Molécula da Fluvastatina Sódio (Novartis), Fórmula:  $C_{24}H_{26}FNO_4$

### 3.3 – Técnica de implantação

Discos de esponjas (poliéster poliuretano) de 8 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram mantidos em álcool 70% v/v durante pelo menos 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos. Estes implantes foram utilizados para induzir a inflamação, angiogênese e fibrose subcutânea e intraperitoneal (MENDES et al., 2007; ANDRADE et al., 1987).

Implantação subcutânea: Os animais foram previamente anestesiados intraperitonealmente, com xilazina/cetamina (8 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente), e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Os animais foram dispostos em mesa cirúrgica e foi realizada uma incisão mediana dorsal de aproximadamente 1 cm em direção caudal. Posteriormente, foi realizada a divulsão do subcutâneo interescapular pela incisão mediana. O disco de esponja foi introduzido e posicionado aproximadamente 0,5 cm da região interescapular. A sutura da incisão foi feita com fio de nylon 3,0 usando ponto Donati. Após recuperação da anestesia os animais ficaram dispostos em gaiolas individuais com água e ração “ad libitum” (ANDRADE et al., 1987).

Implantação abdominal: Após anestesia conforme descrito anteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia e assepsia da região ventral com álcool 70% v/v, dispostos em mesa cirúrgica e realizada uma incisão mediana ventral de aproximadamente 1 cm em direção caudal. O disco de esponja foi introduzido do lado esquerdo da cavidade abdominal. A sutura da incisão foi feita com fio de nylon 3.0 usando ponto Donati. Após recuperação da anestesia os animais ficaram dispostos em gaiolas individuais com água e ração “ad libitum” (MENDES et al, 2007).

### **3.4 - Protocolos experimentais**

#### 3.4.1 - Atorvastatina

##### Avaliação da angiogênese inflamatória em implantes subcutâneos:

Regime de tratamento: os animais foram divididos em três grupos (1 controle e 2 tratados – doses 0,6 e 3,0 mg/kg/dia) de 10 animais cada.

Os grupos tratados receberam atorvastatina na água de beber a partir do dia da implantação, trocada todos os dias, durante todo o período do experimento (9 dias).

##### Avaliação da angiogênese inflamatória em implantes abdominais:

Foram realizados quatro protocolos:

##### 1º protocolo – Tratamento sistêmico por 9 dias

Os animais foram divididos em três grupos (1 controle e 2 tratados – doses 0,6 e 6,0 mg/kg/dia).

Os grupos tratados receberam atorvastatina na água de beber a partir do dia da implantação, trocada todos os dias, durante todo o período do experimento (9 dias).

Posteriormente, outro experimento foi realizado utilizando esse mesmo protocolo, porém com a dose de 30mg/kg/dia.

##### 2º protocolo – Tratamento intraperitoneal por 9 dias

Os animais foram divididos em três grupos (1 controle e 2 tratados – doses 0,6 e 6,0 mg/kg/dia).

Os grupos tratados receberam atorvastatina via intraperitoneal, dissolvida em solução salina estéril, a partir do dia da implantação, por todos os dias, durante todo o período do experimento (9 dias). O grupo controle recebeu injeções de salina estéril via intraperitoneal.

### 3º protocolo – Pré-Tratamento sistêmico

Os animais foram divididos em dois grupos (1 controle e 1 tratado – dose 6,0 mg/kg/dia).

O grupo tratado recebeu atorvastatina na água de beber, trocada todos os dias, a partir de 7 dias antes da implantação, e por todo período do experimento pós-implantação (9dias),

### 4º protocolo – Tratamento sistêmico por 4 dias

Os animais foram divididos em dois grupos (1 controle e 1 tratado – dose 6,0 mg/kg/dia).

O grupo tratado recebeu atorvastatina na água de beber, trocada todos os dias, a partir do dia da implantação, e por todo período do experimento (9dias).

## 3.4.2 - Fluvastatina

### Avaliação da angiogênese inflamatória em implantes subcutâneos:

Regime de tratamento: os animais foram divididos em três grupos (1 controle e 2 tratados – doses 0,6 e 6,0 mg/kg/dia) de 10 animais cada.

Os grupos tratados receberam fluvastatina na água de beber a partir do dia da implantação, trocada todos os dias, durante todo o período do experimento (9 dias).

### Avaliação da angiogênese inflamatória em implantes abdominais:

Os animais foram divididos em três grupos (1 controle e 2 tratados – doses 0,6 e 6,0 mg/kg/dia).

Os grupos tratados receberam fluvastatina na água de beber a partir do dia da implantação, trocada todos os dias, durante todo o período do experimento (9 dias).

Para todos os protocolos, foram realizadas dosagens sanguíneas de lipídeos circulantes, portanto, os animais ficaram em jejum doze horas antes da eutanásia.

Ao nono dia após implantação, os animais foram anestesiados e eutanasiados, por exsanguinação, os implantes retirados, pesados e armazenados a -20°C para processamento posterior e avaliações bioquímicas.

### **3.5 – Remoção dos implantes e coleta de sangue**

No 9º dia pós-implantação os animais foram anestesiados com xilazina/cetamina (8mg/kg e 60mg/kg, respectivamente) e exsanguinados através de punção cardíaca ou do plexo braquial. O sangue coletado foi centrifugado e o soro separado para posterior dosagem de lipídeos. Após eutanásia, os discos de esponja foram retirados através de incisão mediana na região dorsal ou ventral, em seguida, dissecados, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

### **3.6 – Avaliação sérica de lipídeos**

Foram realizadas dosagens de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL no soro coletado dos animais, utilizando o protocolo do kit enzimático da LABTEST.

### **3.7 – Histologia**

Os implantes destinados à avaliação histológica foram colhidos e imediatamente fixados em solução de formol/salina 1:3 durante 24 horas e colocados em álcool 70º GL até o processamento histológico que inclui

desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas foram, então, coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

Os cortes histológicos dos implantes foram examinados ao microscópio óptico, usando-se ocular de 10x e objetivas de 10x, 20x e 40x, e fotografados.

### **3.8 – Avaliação da angiogênese e da infiltração tecidual**

#### **3.8.1 – Dosagem de Hemoglobina**

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intrainplante foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett et al. (1990) e Hu et al. (1995).

As mostras que apresentaram hemorragia ou infecção à análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada implante foi homogeneizado (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2,0 mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest) e adicionados em microtubos (ependorff) de 2,0 mL. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12000 rpm e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540 nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de citocinas, e o precipitado (esponja) dividido e pesado para determinação de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).

### 3.8.2 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Uma das características marcantes do processo inflamatório é a presença de neutrófilos e macrófagos no sítio inflamatório. O acúmulo de neutrófilos pode ser detectado utilizando a enzima mieloperoxidase como um marcador quantitativo de neutrófilos. Para avaliar a atividade da mieloperoxidase utilizamos a técnica de Bradley et al. de 1982.

Após a dosagem de hemoglobina, o precipitado (esponja) foi ressuspenso em 2,0mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,4. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, foram transferidos 300µL desse homogenato para microtubos (ependorf) de 1,5mL e acrescentados 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Após nova homogeneização no vórtex as amostras foram congeladas para posterior dosagem. Após o congelamento, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático.

O ensaio enzimático foi realizado em microtubos (ependorf) de 1,5mL, e a reação seguiu a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, adicionar 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); adicionar 200 µL do sobrenadante da amostra deixar reagir por 1 minuto cronometrado, parar a reação com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico – Merck) a 4 M. Em seguida, foram adicionados 200 µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica feita em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido do implante).



### 3.8.3 – Avaliação da atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A n-acetil-β-D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Essa enzima foi utilizada como um índice da infiltração destas células nos sítios inflamatórios através da técnica de Bailey, 1988.

Após a utilização da esponja para dosagem de hemoglobina, o precipitado foi ressuspenso em 2,0mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). As amostras foram homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugadas em 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

Para o ensaio, foram adicionados 100μL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, foram adicionados 100μL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminida – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100μL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. O p-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-n-acetil-β-D-glicosamina com a n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL<sup>-1</sup>/mg de peso úmido do implante.

### 3.9 – Avaliação da deposição de colágeno

A fibrose foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total (tipos I-V) foi quantificada colorimetricamente baseada na reação do *Picrosirius Red*. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006) como um método de

ligação ao [GLY-X-Y]<sub>n</sub> das seqüências de tripla hélices de todos os colágenos nativos. Sucintamente, as amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100) depois da homogeneização os *debris* foram removidos pela centrifugação. Cinquenta µl do reagente *picrossirius red* foram adicionados a 50 µl da amostra. Após 30 min. de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno- picrossirius red foi separado por centrifugação a 10,000 durante 15 minutos, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1 ml de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (Thermoplate). A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante.

### 3.10 – Dosagem de citocinas

Foram dosadas citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , CCL2 (MCP-1/JE)), pró-angiogênicas (VEGF) e pró-fibrogênicas (TGF- $\beta$ ).

Para a avaliação das citocinas, foi utilizada a reação imunoenzimática de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi congelado em freezer a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução de anticorpo monoclonal anti-camundongo para a citocina a ser analisada e incubadas a 4°C *overnight*. Em seguida fez-se a lavagem da placa quatro vezes com 300µL/poço – Bio-tek Instruments, INC. de Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,4; às placas foi adicionado o tampão de bloqueio (1% BSA ou 10% FBS em PBS, pH 7,4) seguido de encubação por 1 hora. Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 100µL/poço dos padrões (15-1000 pg/mL) e das amostras diluídas em 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,4 e em seguida as placas foram novamente incubadas a 4°C *overnight*. Após nova lavagem das placas, foram adicionados 100µL/poço de solução de anticorpo

biotinilado anti-camundongo para a citocina em questão e as placas incubadas por 2 horas. Após lavagem, foram adicionados 100µL/poço de solução de estreptavidina-HRP às placas, e incubadas por 20 minutos. Após nova lavagem, foi realizada a reação cromogênica com o substrato o-fenilenodiamina (OPD - Sigma), 100µL/poço diluído em tampão citrato (acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 v/v), pH 5,0 e as placas incubadas, ao abrigo da luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e as placas analisadas em O.D. 492nm. Todos os passos de incubação (exceto aqueles *overnight*) foram feitos a temperatura ambiente. A concentração da citocina de cada implante foi calculada a partir de uma curva padrão e os resultados expressos em concentração de proteína (pg/mL) por implante.

### **3.11 – Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)**

Para este conjunto de experimentos, três grupos diferentes de animais foram tratados sistemicamente com ou 0,06 ou 0,6 ou 6 mg/kg de Fluvastatina. A produção basal de NO nos implantes de esponjas foi medida no perfusato com microsensores de carbono usando uma membrana permeável ao NO (ISO-NOPF100, World Precision Instruments Inc., E.U.A.). Os microsensores de carbono ao NO foram estabilizados por 1h em solução tampão de Krebs (em mM: NaCl 110,8, KCl 5,9, 25,0 NaHCO<sub>3</sub>, 1,07 MgSO<sub>4</sub>, 2,49 CaCl<sub>2</sub>, 2,33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 11,51 glicose, pH 7,4). No dia 9 após a implantação, os animais foram sacrificados, os implantes cuidadosamente retirados, pesados e colocados em 50mL de tampão de Krebs por 5 minutos. Em seguida, foram colocados em 1,5 mL de solução de Krebs gaseada (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), a 37°C. Os microsensores de carbono foram conectados a um amplificador-recorder (TBR - 4100 Free Radical Analyzer; World Precision Instruments, Inc., E.U.A.) e a um computador pessoal equipado com uma placa de aquisição de dados (Lab-Trax-4/16; World Precision Instruments Inc., E.U.A.), usando o software Lab-Trax (Mundo Precision Instruments Inc., E.U.A.). As correntes

(nA) foram medidas pelos microsensores continuamente (30 minutos) e as concentrações de NO determinadas por curvas de calibração de concentrações conhecidas de SNAP (0,2 a 500nM).

### **3.12 – Análise estatística**

Os resultados foram apresentados pelas médias  $\pm$  e.p.m. dos dados. A comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se o teste *t* de Student, quando os dados consistiram de mais de dois grupos foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do subteste Newman-keuls. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0.05$ . Para realização da análise e construção de gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.

## **RESULTADOS**

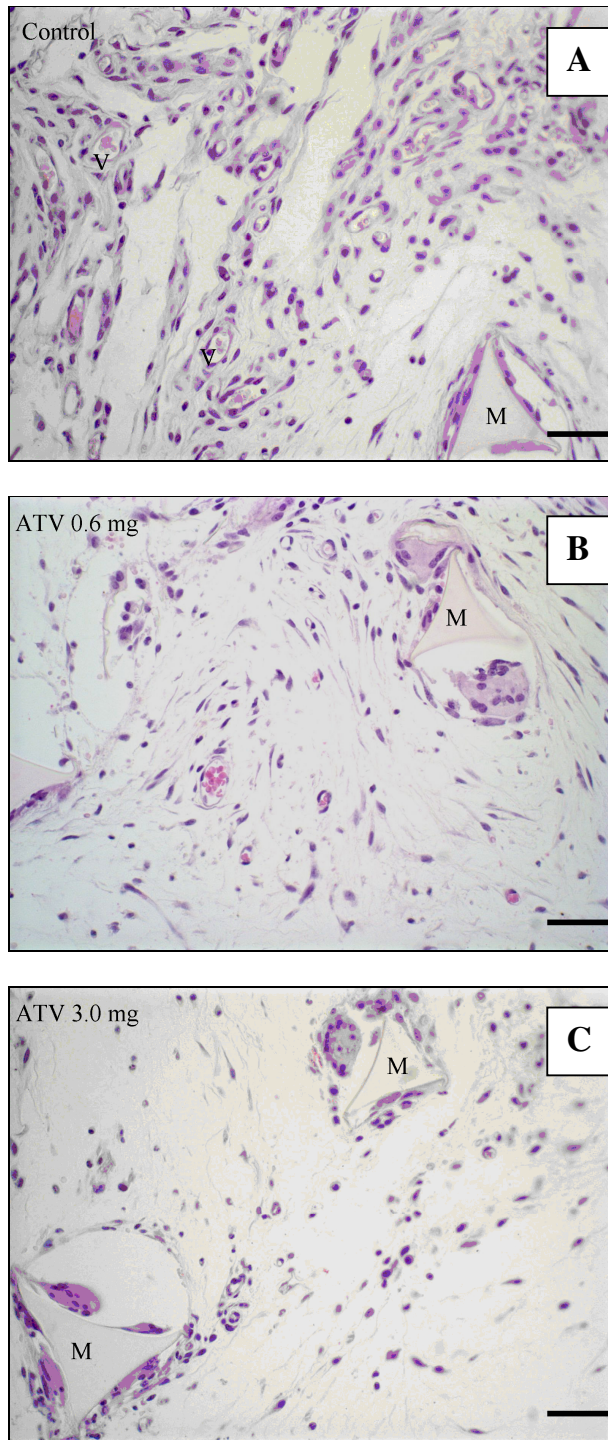
## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Efeito da atorvastatina na inflamação, angiogênese e deposição de colágeno subcutâneo

A administração sistêmica de atorvastatina (0,6 e 3mg/kg) durante 8 dias não apresentou alterações visíveis no comportamento dos animais. O procedimento cirúrgico, a matriz de esponja, e o tratamento foram bem tolerados por todos os animais. Ambas as doses de atorvastatina (0,6 e 3mg/kg) não causaram redução significativa nos níveis séricos do colesterol total (controle  $127 \pm 5$  vs atorvastatina 0,6mg  $126 \pm 18$  vs atorvastatina 3mg  $143 \pm 12$  mg/dl), triglicerídeos ( $42,4 \pm 8$  vs.  $52 \pm 9$  vs.  $38 \pm 7$ ), HDL ( $23 \pm 2$  vs.  $21 \pm 2$  vs.  $23 \pm 1$ ) e LDL ( $36 \pm 10$  vs.  $39 \pm 6$  vs.  $35 \pm 5$ ).

#### 4.1.1 – Avaliação histológica

Não foram observados sinais visíveis de infecção ou rejeição nos implantes durante o período de 9 dias do experimento. A implantação subcutânea de discos de esponja em camundongos induziu uma resposta de angiogênese inflamatória levando ao preenchimento da matriz sintética com tecido fibrovascular. Esse tecido apresentou-se vascularizado contendo células inflamatórias, células gigantes multinucleadas e células semelhantes a fibroblastos intercalados na matriz do implante. O tratamento com atorvastatina (0,6 e 3,0 mg/kg) inibiu a formação do tecido fibrovascular e os componentes celulares nos implantes (Figura 4).

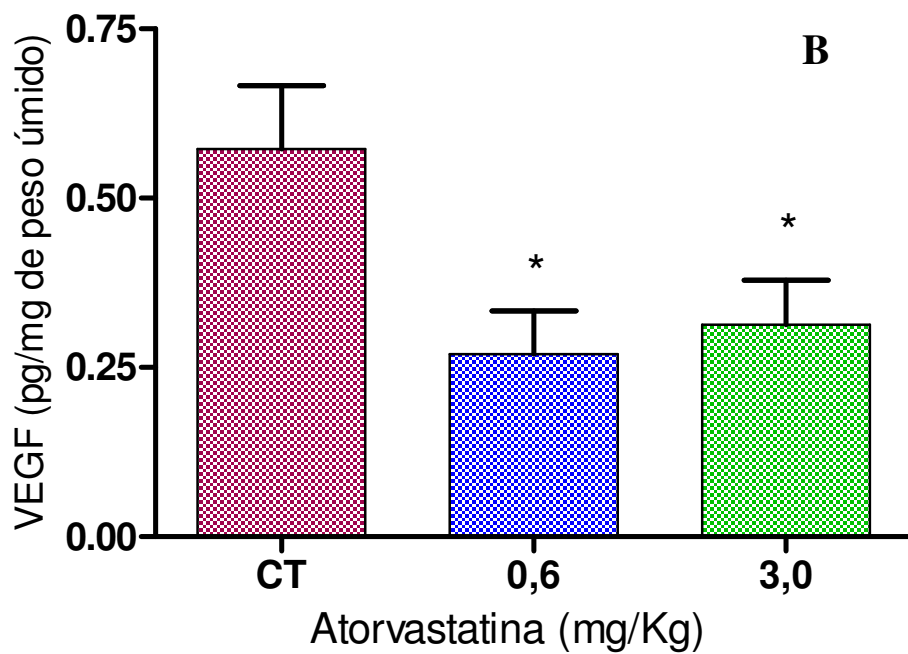
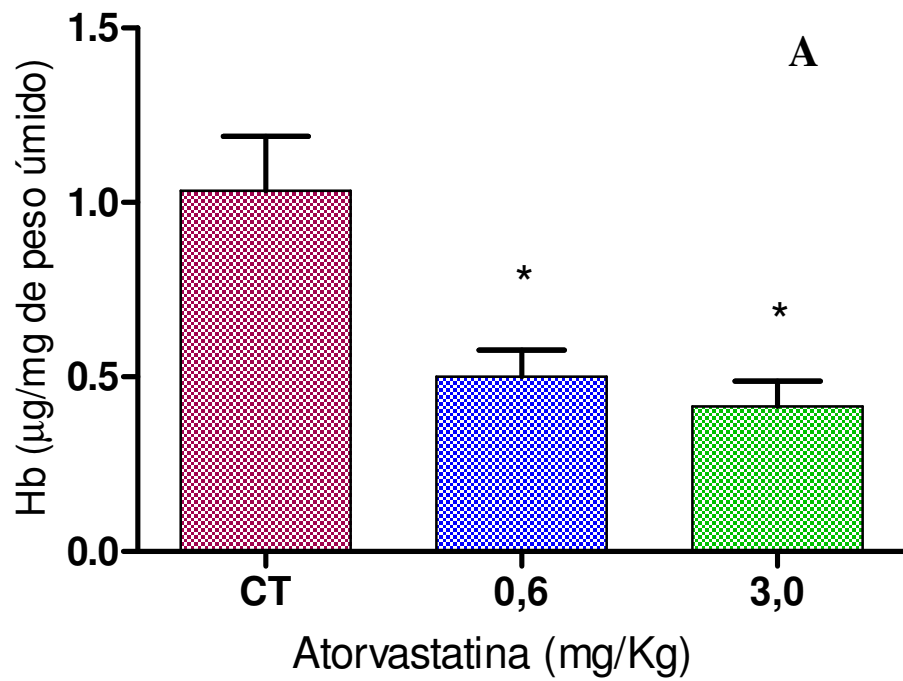


**Figura 4:** Cortes histológicos (5  $\mu$ m, corados com H&E) do tecido fibrovascular que infiltra os poros do implante de esponjas subcutâneo. O tecido recém formado é composto de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. Em (A) o tecido fibrovascular do controle é mais denso e vascularizado comparado com os grupos tratados com atorvastatina nas doses de 0,6 (B) e 3,0 (C) mg/kg. M – Matriz; V – vasos sanguíneos; Barra - 100  $\mu$ m.

#### 4.1.2 – Avaliação da Angiogênese

As doses de atorvastatina (0,6 e 3,0 mg/kg) dadas diariamente via oral aos diferentes grupos de camundongos durante 8 dias reduziu a neovascularização dos implantes como observado pelas alterações no conteúdo de hemoglobina (Gráfico 1A) e níveis de VEGF dos implantes (um marcador da angiogênese) (Gráfico 1B). Os níveis de hemoglobina nos implantes foram  $1,0 \pm 0,15$   $\mu\text{g Hb/mg}$  de peso úmido (controle, n=10); versus  $0,5 \pm 0,07$  (0,6 mg/kg; n=10) versus  $0,42 \pm 0,07$  (3 mg/kg; n=10). A avaliação do VEGF nos implantes mostrou que o tratamento com atorvastatina diminuiu os níveis desta citocina  $0,26 \pm 0,06$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $0,31 \pm 0,06$  (3,0 mg/kg; n=10) nos implantes tratados comparados ao controle  $0,57 \pm 0,09$ ; n=10.

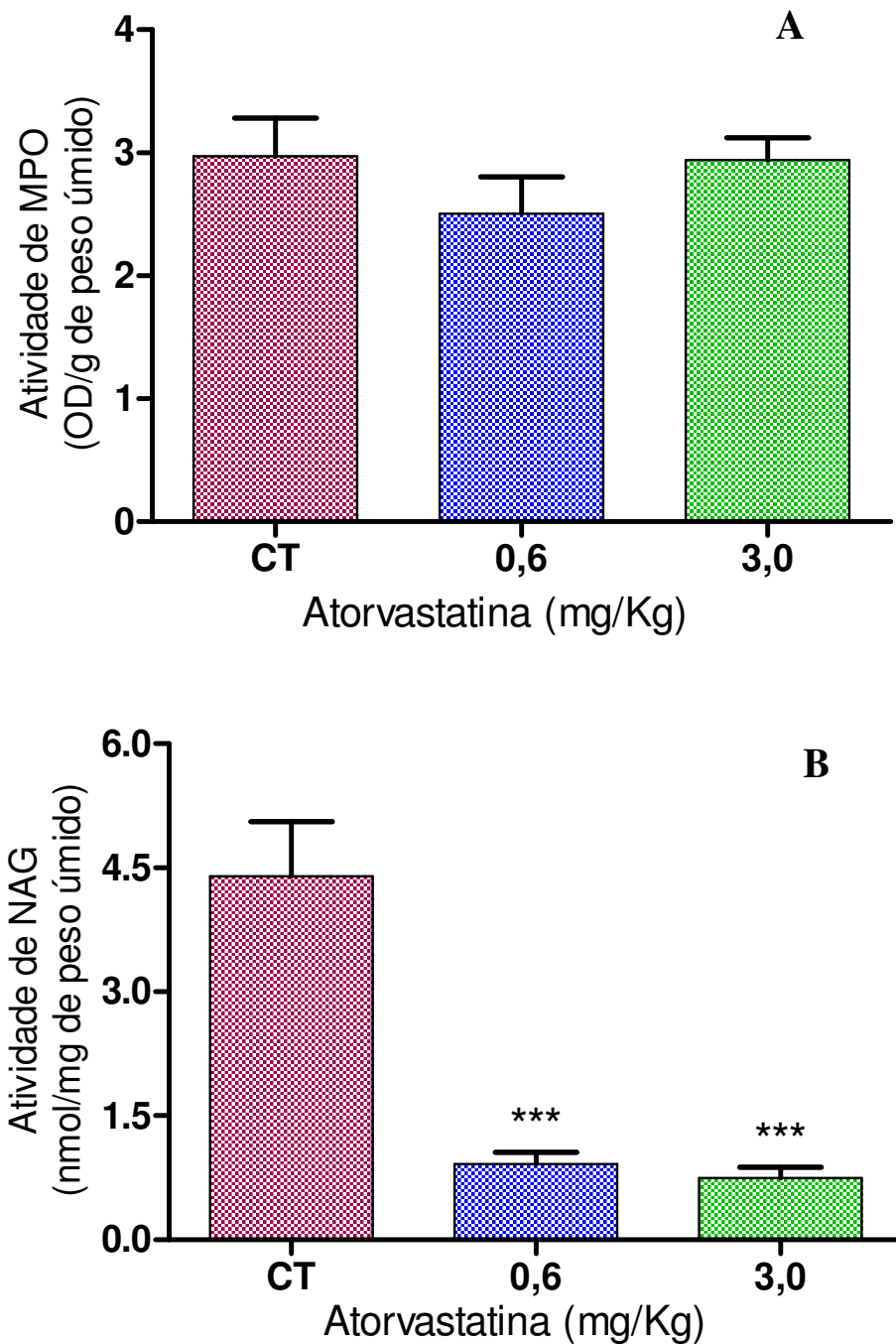




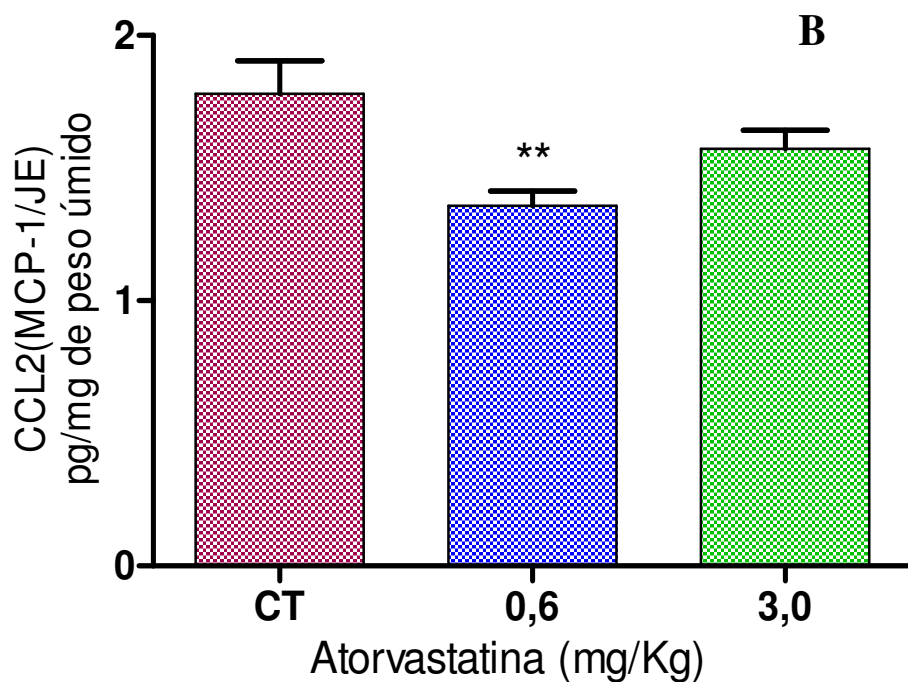
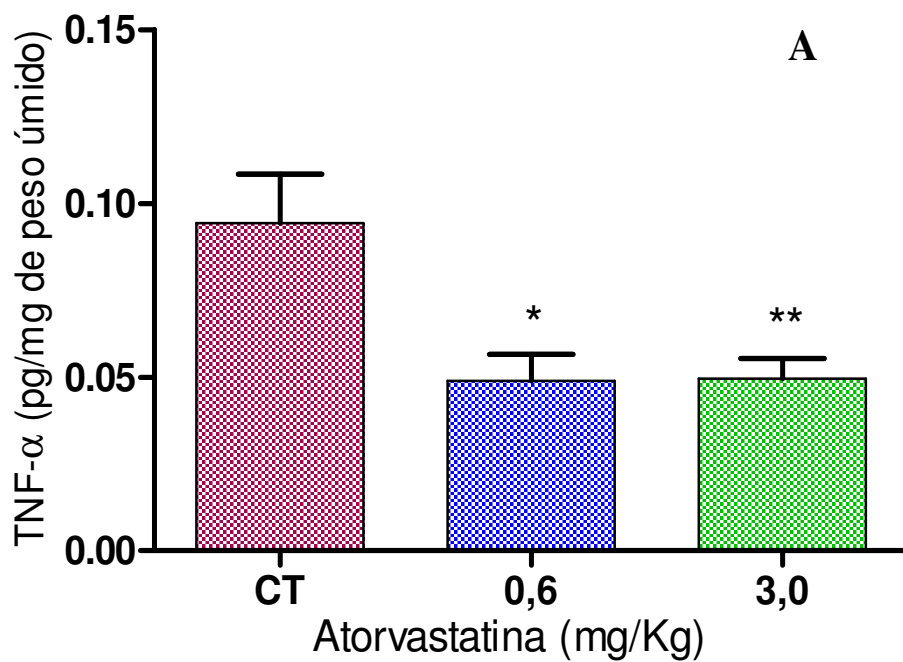
**Gráfico 1:** Efeitos da atorvastatina na angiogênese induzida por implantes de esponja no tecido subcutâneo. Em A o conteúdo de hemoglobina do tecido diminuiu após o tratamento com as doses de 0,6 e 3,0 mg/kg de atorvastatina. Em B é observada a redução dos níveis de VEGF pelo tratamento com atorvastatina. CT – Controle. Os valores representam as médias ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 10 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

#### 4.1.3 – Avaliação da inflamação

Os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzido pela esponja foram determinados pela estimativa do número de leucócitos presentes no implante avaliados pelas atividades de enzimas e níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e CCL2(MCP-1/JE)). O número de neutrófilos (como atividade de MPO) não foi afetado pelo tratamento com atorvastatina  $2,97 \pm 0,31$  (controle; n=10) versus  $2,50 \pm 0,30$  (0,6 mg/kg; n=9) e  $2,94 \pm 0,18$  (3,0 mg/kg; n=10) (Gráfico 2A). No entanto, o composto em ambas as doses (0,6 e 3,0 mg/kg) diminuiu a atividade de NAG (número de macrófagos)  $4,40 \pm 0,65$  (controle; n=10) versus  $0,91 \pm 0,13$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $0,74 \pm 0,12$  (3,0 mg/kg; n=10) (Gráfico 2B). Também foi observada diminuição nos níveis intra-implante de TNF-  $\alpha$   $0,09 \pm 0,01$  (controle; n=10) versus  $0,04 \pm 0,007$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $0,04 \pm 0,005$  (3,0 mg/kg; n=10) (Gráfico 3A) e CCL2(MCP-1/JE)  $1,77 \pm 0,12$  (controle; n=10) versus  $1,35 \pm 0,05$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $1,57 \pm 0,07$  (3,0 mg/kg; n=10) nos implantes (gráfico GB).



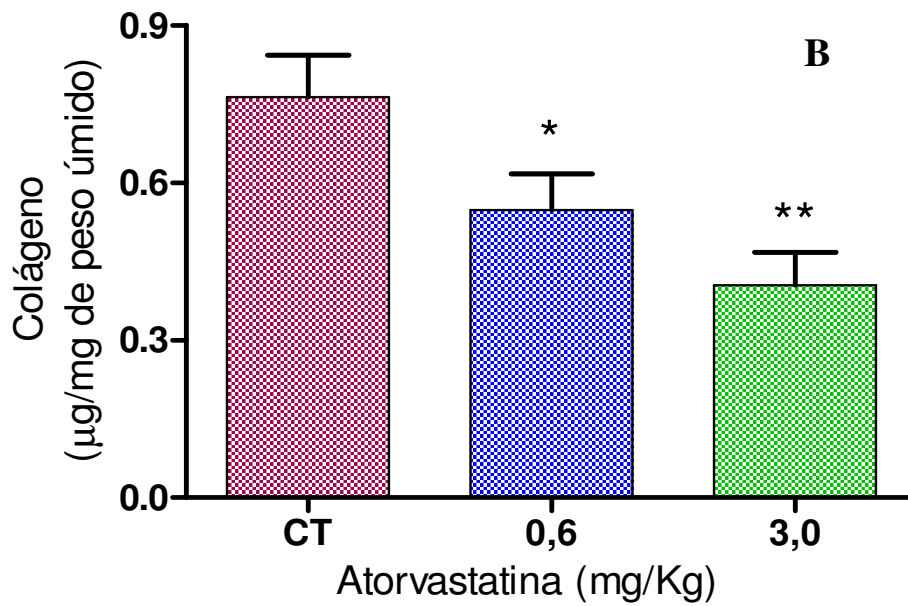
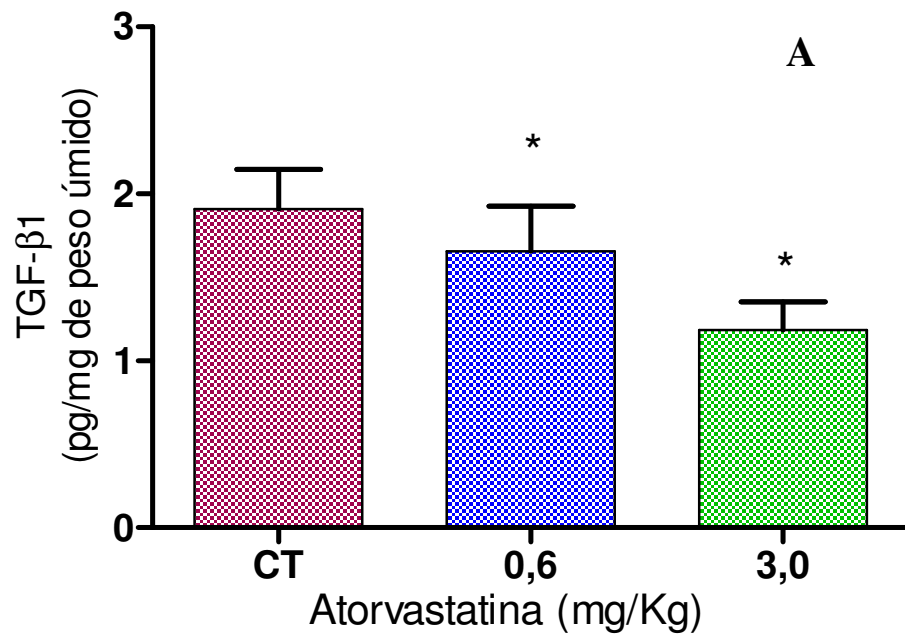
**Gráfico 2:** Efeitos da atorvastatina (0,6 e 3,0mg/kg) no infiltrado de células inflamatórias do tecido subcutâneo. A (acúmulo de neutrófilos), B (acúmulo de macrófagos), no tecido fibrovascular dos implantes subcutâneos. O tratamento não interferiu no infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO), mas diminuiu significativamente o infiltrado de macrófagos (atividade de NAG). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 9 a 10 animais. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle.



**Gráfico 3:** Efeitos da atorvastatina (0,6 e 3,0mg/kg) na produção de citocinas inflamatórias do tecido fibrovascular de implantes subcutâneos. O tratamento diminuiu significativamente os níveis da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  (A) e os níveis da quimiocina para macrófagos CCL2/MCP-1/JE (B). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 8 a 10 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle.

#### 4.1.4 – Avaliação da deposição de colágeno e TGF- $\beta$ 1

A deposição de colágeno e os níveis de TGF- $\beta$ 1 (citocina pró-fibrogênica) foram avaliados para determinar o efeito da atorvastatina nestes componentes do tecido fibrovascular. Ambas as doses de atorvastatina (0,6 e 3,0 mg/kg) foram eficazes em diminuir a quantidade de colágeno e os níveis da citocina intra-implante. Os níveis de TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante dos implantes foi de  $1,90 \pm 0,23$  (controle; n=10) versus  $1,65 \pm 0,27$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $1,18 \pm 0,16$  (3,0 mg/kg; n=10) e a deposição do colágeno intra implante de  $0,76 \pm 0,08$  (controle; n=10) versus  $0,54 \pm 0,06$  (0,6 mg/kg; n=10) e  $0,40 \pm 0,06$  (3,0 mg/kg; n=10). (Gráfico 4A e B).

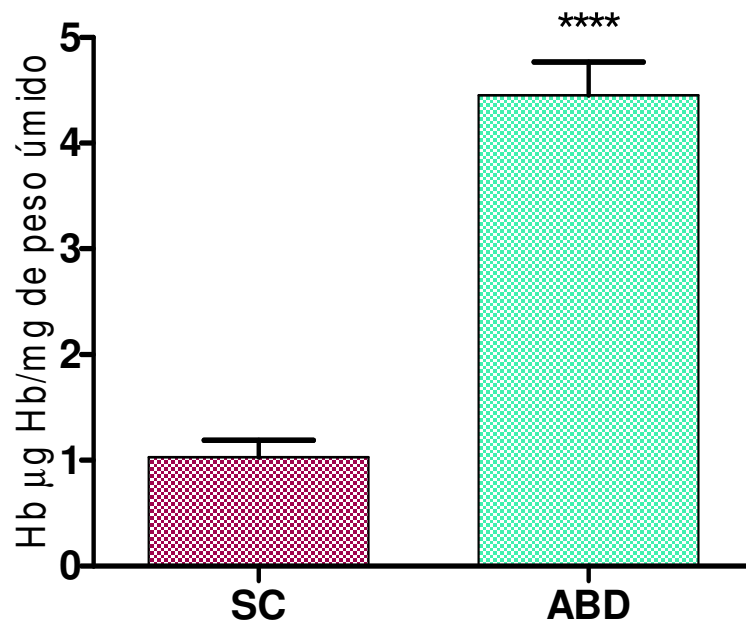


**Gráfico 4:** Efeitos da atorvastatina nos níveis de TGF-β1 (A) e na deposição de colágeno (B) no implante de esponja subcutâneo. Foi observada uma completa diminuição dos parâmetros após o tratamento sistêmico com ambas as doses (0,6 e 3,0 mg/kg) de atorvastatina. CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 8 a 10 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle.

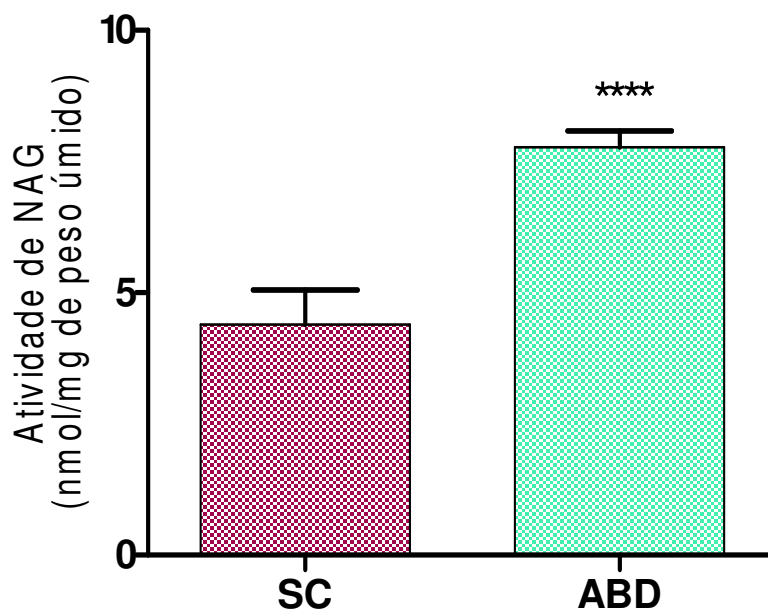
## 4.2 – Efeito da atorvastatina cavidade abdominal

Os efeitos da atorvastatina foram avaliados também nos componentes inflamatório, angiogênico e fibrogênico de implantes alojados na cavidade abdominal. Neste sítio anatômico as respostas angiogênica e inflamatória do hospedeiro diferem quanto à intensidade daquela observada em implantes subcutâneos (BARROS et al., 2007). Para esta série de experimentos a maior dose utilizada foi de 6mg/kg (2 vezes) a dose que promoveu efeitos máximos inibitórios na angiogênese inflamatória de implantes subcutâneos.

Os gráficos 5 e 6 mostram que o conteúdo de hemoglobina é cerca de 4 vezes maior nos implantes abdominais em relação aos subcutâneos e que o recrutamento de macrófagos (atividade de NAG) é aproximadamente 2 vezes maior nos implantes abdominais. O conteúdo de hemoglobina dos implantes subcutâneos foi  $1,033 \pm 0,15$  *versus*  $4,452 \pm 0,31$  dos implantes abdominais (Gráfico 5). A atividade da NAG entre os implantes subcutâneos foi  $4,400 \pm 0,65$  *versus*  $7,768 \pm 0,30$  nos implantes abdominais (Gráfico 6).



**Gráfico 5:** Comparação entre os conteúdos de hemoglobina dos implantes subcutâneos e abdominais de grupos controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 8 a 10 animais. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparado ao grupo subcutâneo. SC – subcutâneo, ABD – abdominal.

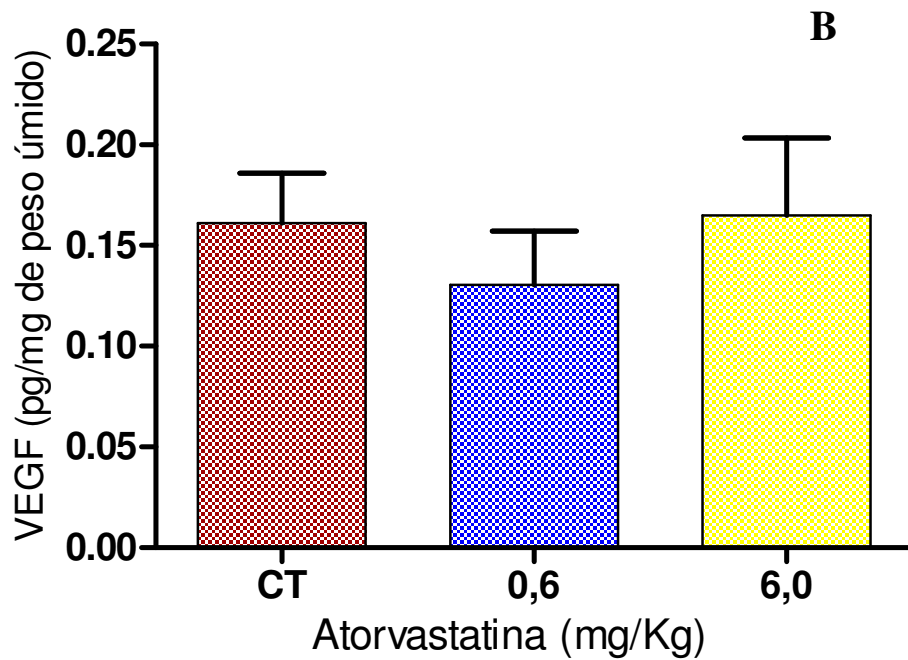
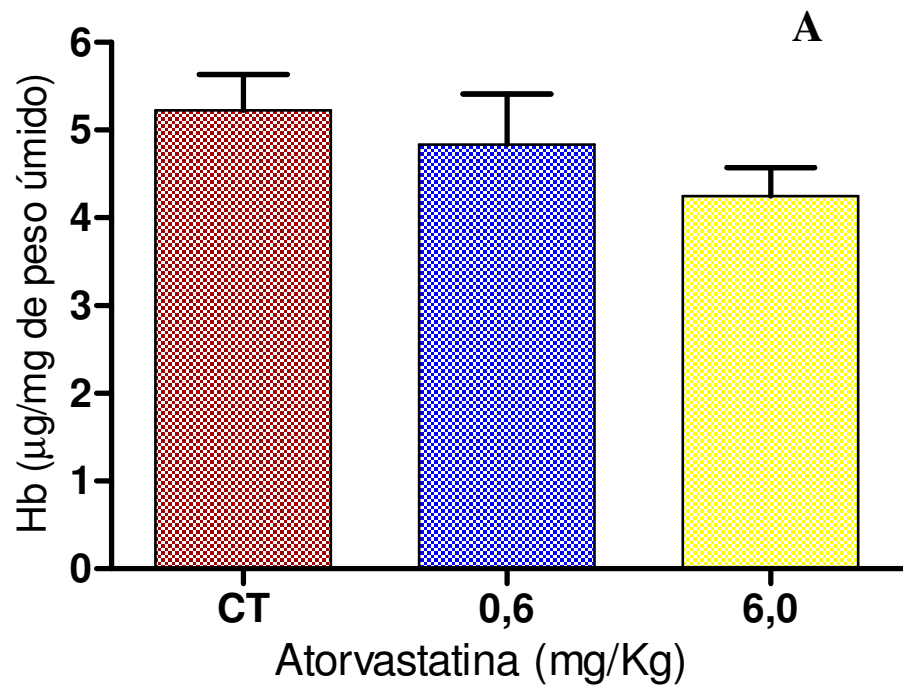


**Gráfico 6:** Comparação entre a atividade da enzima n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) dos implantes subcutâneos e abdominais de grupos controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 8 a 10 animais. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparado ao grupo subcutâneo. SC – subcutâneo, ABD – abdominal.

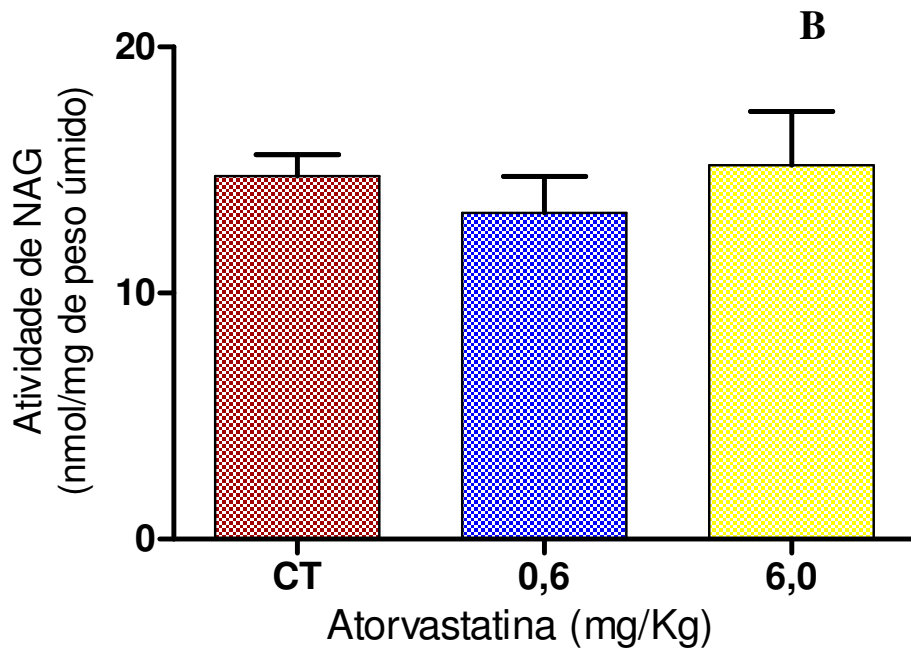
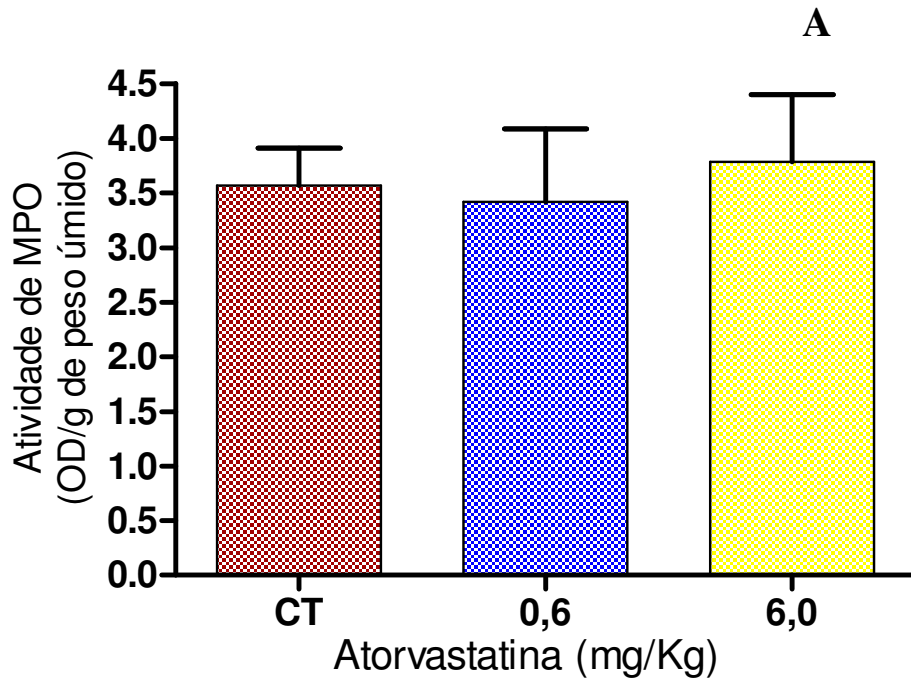


#### **4.2.1 – Protocolo 1 – Administração sistêmica da atorvastatina**

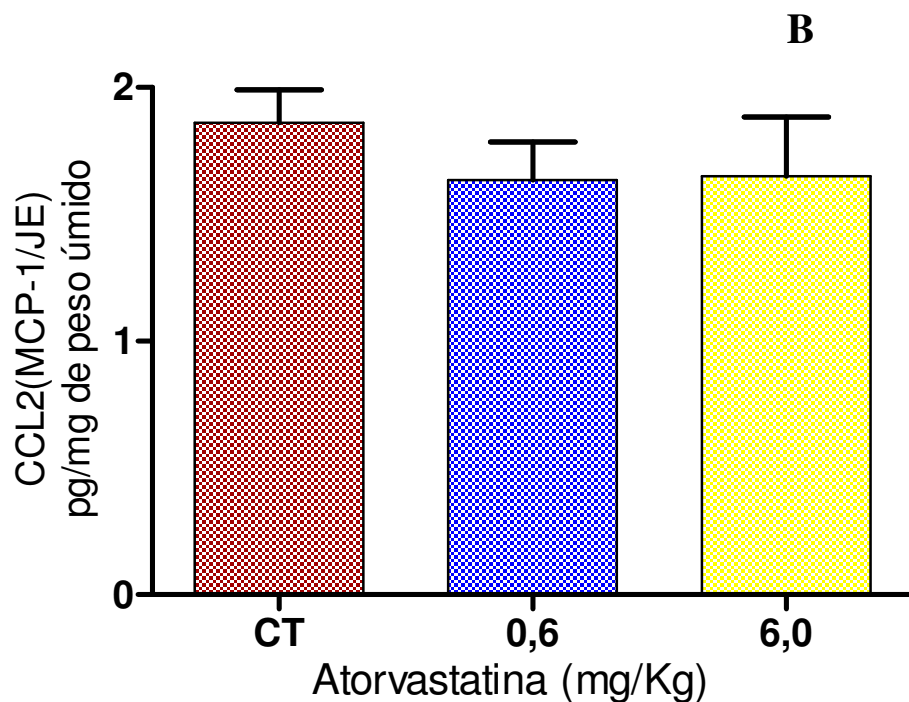
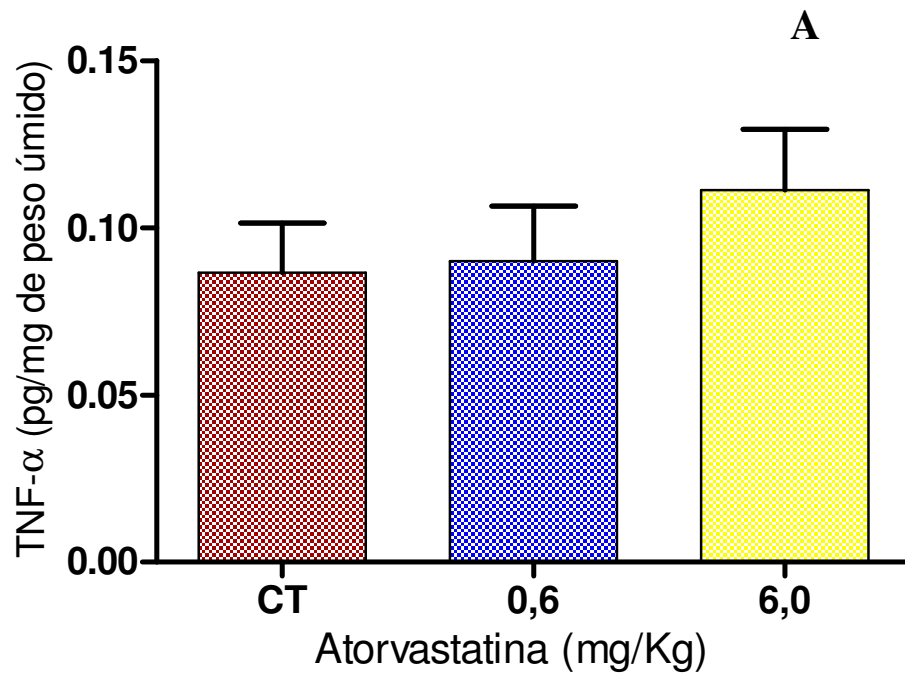
Neste 1º protocolo, a administração oral de atorvastatina foi semelhante ao protocolo que identificou as atividades anti-angiogênica, anti-inflamatória e anti-fibrogênica deste composto em implantes subcutâneos. No entanto, quando avaliados seus efeitos na cavidade abdominal, a atorvastatina não foi capaz, nas doses estudadas, de alterar qualquer parâmetro. Os resultados destes experimentos são mostrados nos gráficos 7 (atividade angiogênica); gráficos 8 A e B (atividade inflamatória); gráficos 9 A e B (citocinas pró-inflamatórias) e gráficos 10 A e B (atividade fibrogênica).



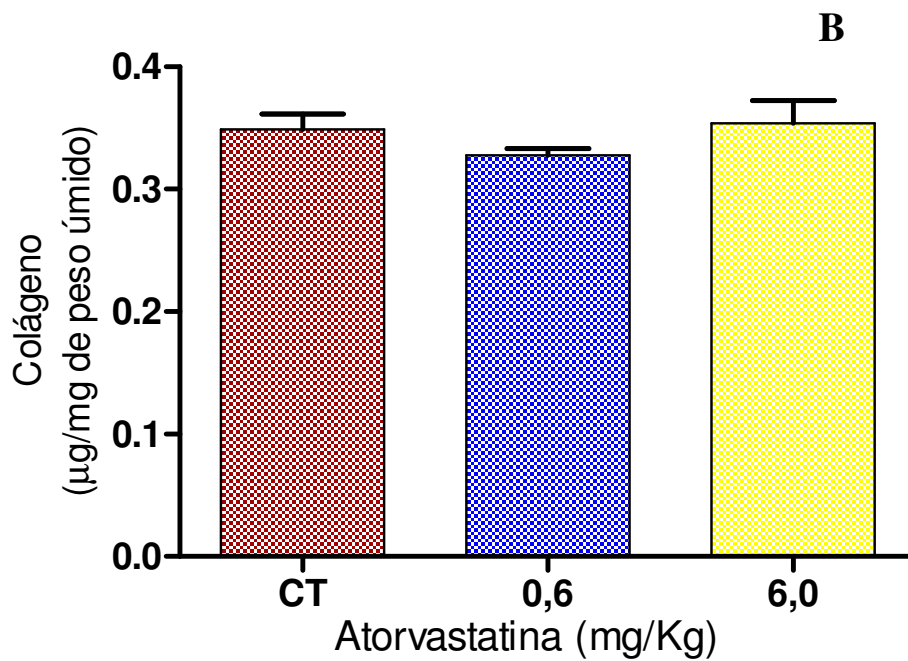
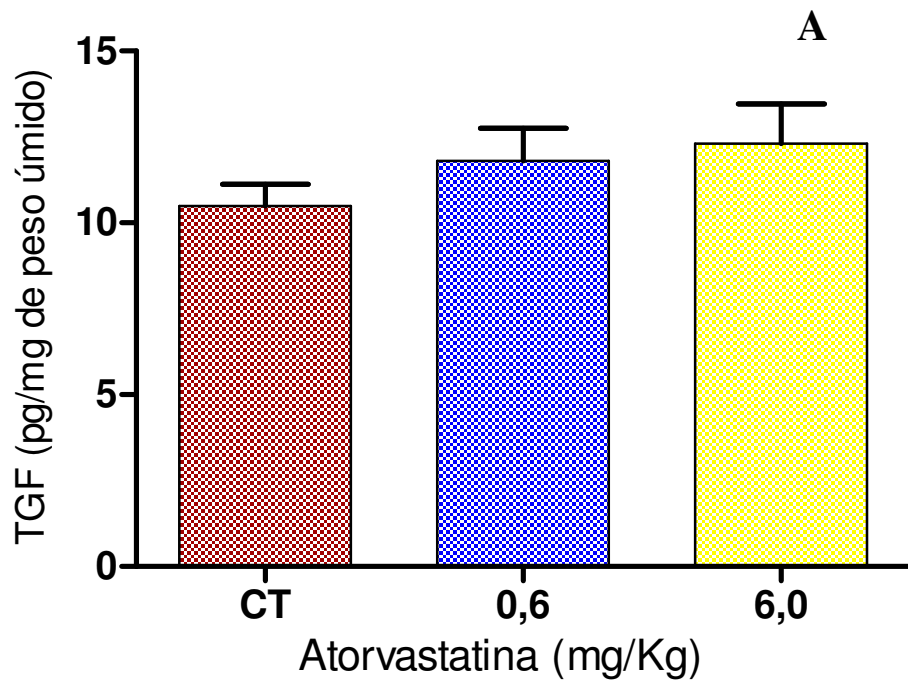
**Gráfico 7:** Efeito da atorvastatina, por administração oral, na angiogênese induzida por implantes de esponja na cavidade abdominal. O conteúdo de hemoglobina do tecido não alterou após o tratamento em nenhuma das doses avaliadas. CT – controle. Os valores representam as médias ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 7 a 8 animais.



**Gráfico 8:** Efeitos da atorvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) no infiltrado de células inflamatórias do implante abdominal com tratamento via oral. Acúmulo de neutrófilos (A), acúmulo de macrófagos (B), nos implantes de esponja. O tratamento não interferiu o infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO), nem no infiltrado de macrófagos (atividade de NAG). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 6 a 8 animais.



**Gráfico 9:** Efeitos da atorvastatina (0,6 e 3,0 mg/kg) nas citocinas inflamatórias. O tratamento não alterou os níveis da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  (A) nem os níveis da quimiocina para macrófagos CCL2/MCP-1/JE (B). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 7 a 8 animais.



**Gráfico 10:** Efeitos da atorvastatina nos níveis de TGF- $\beta$ 1 (A) e na deposição de colágeno (B) no implante de esponja abdominal com tratamento via oral. O tratamento não alterou os níveis de TGF-  $\beta$ 1 nem a deposição de colágeno nos implantes em nenhuma das doses estudadas. CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 8 a 10 animais.

Tendo em vista que a atorvastatina foi ineficaz em produzir qualquer efeito na angiogênese inflamatória dos implantes abdominais nas doses e protocolos mencionados, outras doses e regimes de tratamento foram feitos.

Ainda utilizando o protocolo 1, aumentamos a dose de atorvastatina para 30 mg/kg/dia. Mesmo com uma dose 5 vezes maior não observamos qualquer nos parâmetros avaliados (Quadro 1).

Atorvastatina 30mg/kg		Hb	MPO	NAG	Colágeno
	<b>CT</b>	3,749 ± 0,4286 N = 8	4,728 ± 0,7470 N = 8	19,470 ± 2,152 N = 8	0,240 ± 0,01918 N = 8
<b>30</b>	4,391 ± 0,7298 N = 8	3,879 ± 0,8448 N = 8	18,090 ± 2,160 N = 8	0,240 ± 0,02809 N = 8	

**Quadro 1:** Efeito da atorvastatina administrada sistemicamente com a dose de 30 mg/kg/dia no implante de esponja da cavidade abdominal. Não houve alteração em qualquer parâmetro avaliado. Resultados apresentados pela média, ± e.p.m e N = n° de animais.

#### 4.2.2 – Protocolo 2 – Administração intraperitoneal da atorvastatina

A atorvastatina administrada na cavidade abdominal (i.p. nas doses de 0,6; 3,0 e 6,0 mg/Kg/dia) não alterou os componentes angiogênico (conteúdo de hemoglobina), inflamatório (atividade de MPO e NAG) e fibrogênico (deposição de colágeno) do implante na cavidade abdominal (Quadro 2).

		Hb	MPO	NAG	Colágeno
Atorvastatina (i.p.)	CT	4,711 ± 0,4896 N = 8	3,629 ± 0,7058 N = 8	8,455 ± 0,3760 N = 8	0,474 ± 0,02762 N = 9
	0,6	5,897 ± 1,231 N = 6	3,587 ± 1,311 N = 6	8,378 ± 0,9178 N = 6	0,431 ± 0,02983 N = 8
	3	4,990 ± 1,081 N = 7	4,444 ± 1,251 N = 7	10,110 ± 1,278 N = 7	0,428 ± 0,03241 N = 9
	6	5,561 ± 0,6899 N = 8	4,653 ± 1,153 N = 8	9,989 ± 0,6380 N = 8	0,452 ± 0,03600 N = 10

**Quadro 2:** Efeito da atorvastatina administrada via intraperitoneal (i.p.) no implante de esponja da cavidade abdominal. Não houve alteração em qualquer parâmetro avaliado. Resultados apresentados pela média, ± e.p.m e N = n° de animais.

#### 4.2.3 – Protocolo 3 – Pré-tratamento sistêmico da atorvastatina

A atorvastatina administrada por 7 dias antes da implantação e por 8 dias pós implantação (6,0 mg/Kg/dia) também não alterou os componentes angiogênico (conteúdo de hemoglobina), inflamatório (atividade de MPO e NAG) e fibrogênico (deposição de colágeno) do implante na cavidade abdominal (Quadro 3).

		Hb	MPO	NAG	Colágeno
Pré-tratamento Atorvastatina	CT	3,749 ± 0,4286 N = 8	4,728 ± 0,7470 N = 8	19,470 ± 2,152 N = 8	0,240 ± 0,01918 N = 8
	6	3,870 ± 0,6351 N = 8	5,061 ± 0,7261 N = 8	21,640 ± 3,219 N = 8	0,266 ± 0,02267 N = 8

**Quadro 3:** Efeito do pré-tratamento de atorvastatina administrada sistemicamente no implante de esponja da cavidade abdominal. Não houve alteração em qualquer parâmetro avaliado. Resultados apresentados pela média, ± e.p.m e N = n° de animais.

#### 4.2.4 – Protocolo 4 – Tratamento sistêmico da atorvastatina por 4 dias

A diminuição do tempo de experimento de 9 para 4 dias teve como objetivo diminuir a intensidade da angiogênese inflamatória induzida pelo implante para observar se o tratamento com a atorvastatina apresentaria efeito em algum dos componentes avaliados. Nesse protocolo a atorvastatina (6,0 e 30 mg/Kg/dia) novamente não alterou os componentes angiogênico (conteúdo de hemoglobina), inflamatório (atividade de MPO e NAG) e fibrogênico (deposição de colágeno) do implante na cavidade abdominal (Quadro 4).

		Hb	MPO	NAG	Colágeno
Tratamento por 4 dias	CT	2,066 ± 0,5496 N = 5	5,228 ± 1,030 N = 5	23,080 ± 3,008 N = 4	0,2088 ± 0,01223 N = 4
	6	2,718 ± 0,5715 N = 4	5,596 ± 1,294 N = 5	24,690 ± 2,199 N = 6	0,2612 ± 0,01554 N = 6
	30	3,050 ± 0,5084 N = 3	4,804 ± 0,5589 N = 5	19,860 ± 3,172 N = 5	0,2558 ± 0,02337 N = 4

**Quadro 4:** Efeito da atorvastatina administrada sistemicamente por 4 dias no implante de esponja da cavidade abdominal. Não houve alteração em qualquer parâmetro avaliado. Resultados apresentados pela média, ± e.p.m e N = nº de animais.



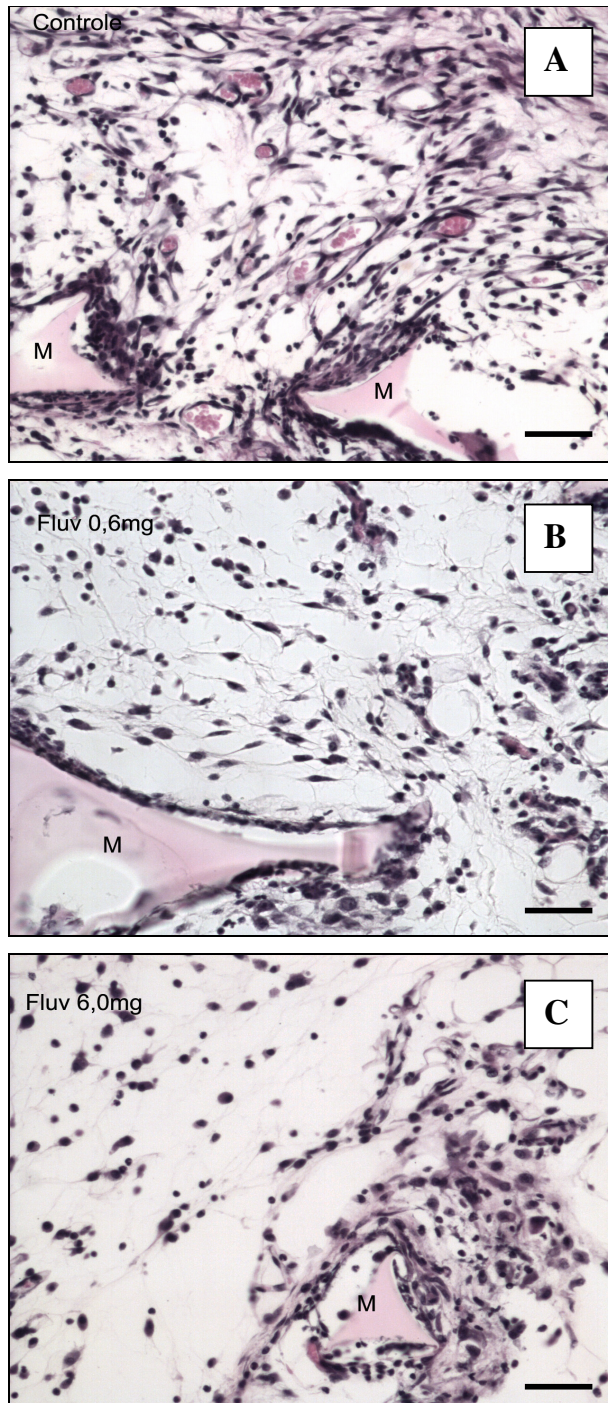
### **4.3 – Efeito da fluvastatina na angiogênese inflamatória em implantes subcutâneos**

Os efeitos de outra estatina (fluvastatina) foram avaliados em ambos os implantes (subcutâneo e abdominal) para verificar possíveis ações diferenciais entre as duas estatinas. Seus efeitos foram avaliados para os níveis séricos de colesterol e frações, inflamação, angiogênese e citocinas.

Os resultados apresentados mostram que a administração sistêmica de fluvastatina (0,6 e 6 mg/kg) durante 8 dias não apresentou alterações visíveis no comportamento dos animais. O procedimento cirúrgico, a matriz de esponja, e o tratamento foram bem tolerados por todos os animais. Ambas as doses de fluvastatina (0,6 e 6 mg/kg) não causaram redução significativa nos níveis séricos do colesterol total (controle  $139 \pm 13$  vs fluvastatina 0,6 mg  $155 \pm 16$  vs fluvastatina 6 mg  $158 \pm 19$  mg/dl), triglicerídeos ( $96 \pm 5$  vs.  $113 \pm 23$  vs.  $103 \pm 18$ ), HDL ( $58 \pm 6$  vs.  $56 \pm 3$  vs.  $42 \pm 2$ ) e LDL ( $67 \pm 9$  vs.  $76 \pm 10$  vs.  $73 \pm 17$ ).

#### **4.3.1 – Avaliação histológica**

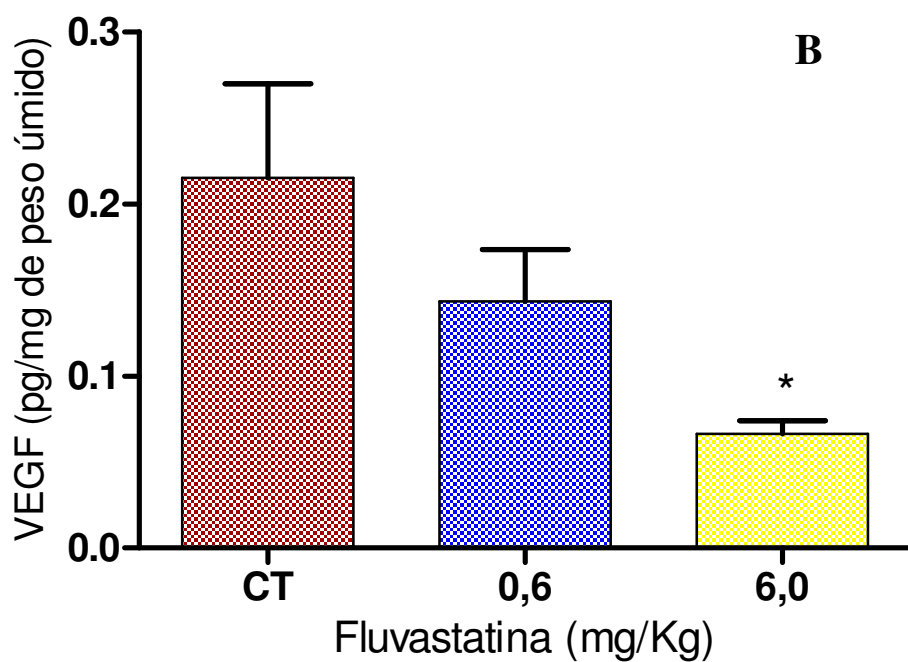
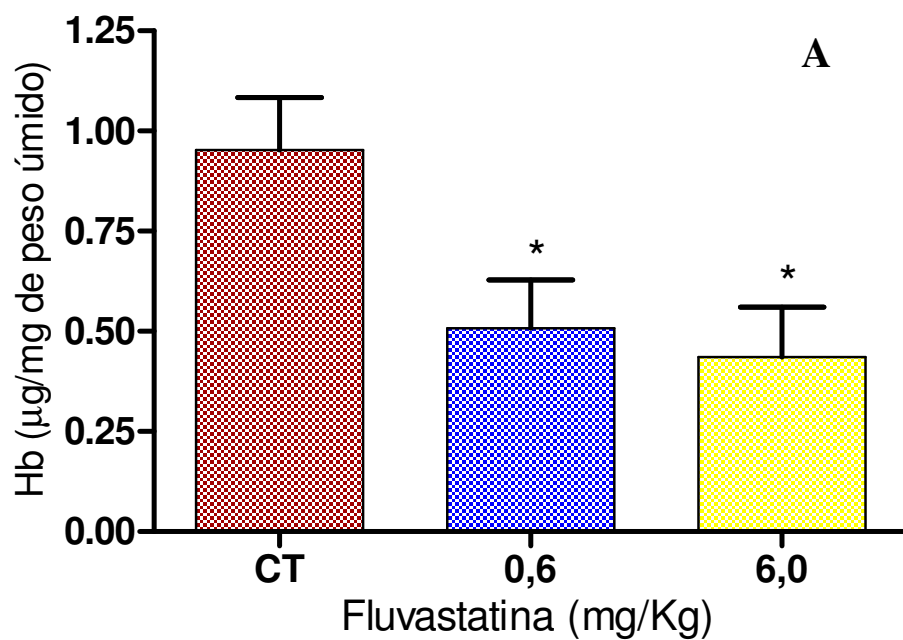
Não foram observados sinais visíveis de infecção ou rejeição nos implantes durante o período de 9 dias do experimento. A implantação subcutânea de discos de esponja em camundongos induziu uma resposta de angiogênese inflamatória causando um preenchimento com tecido fibrovascular na matriz sintética. Esse tecido estava vascularizado contendo células inflamatórias, células gigantes multinucleadas e células semelhantes a fibroblastos intercalados com a matriz do implante. O tratamento com fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) inibiu claramente o tecido fibrovascular e os componentes celulares nos implantes (Figura 5).



**Figura 5:** Cortes histológicos (5  $\mu$ m, corados com H&E) do tecido fibrovascular que infiltra os poros do implante de esponjas subcutâneo. O tecido recém formado é composto de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. Em (A) o tecido fibrovascular do controle é mais denso e vascularizado comparado com os grupos tratados com fluvastatina nas doses de 0,6 (B) e 6,0 (C) mg/kg. M – Matriz; Barra - 100  $\mu$ m.

#### 4.3,2 – Avaliação da angiogênese

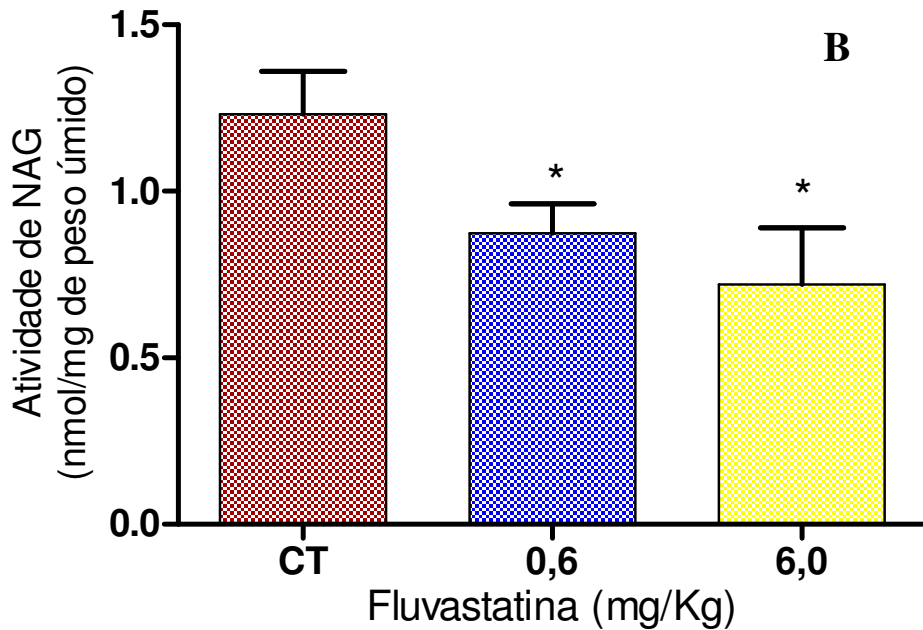
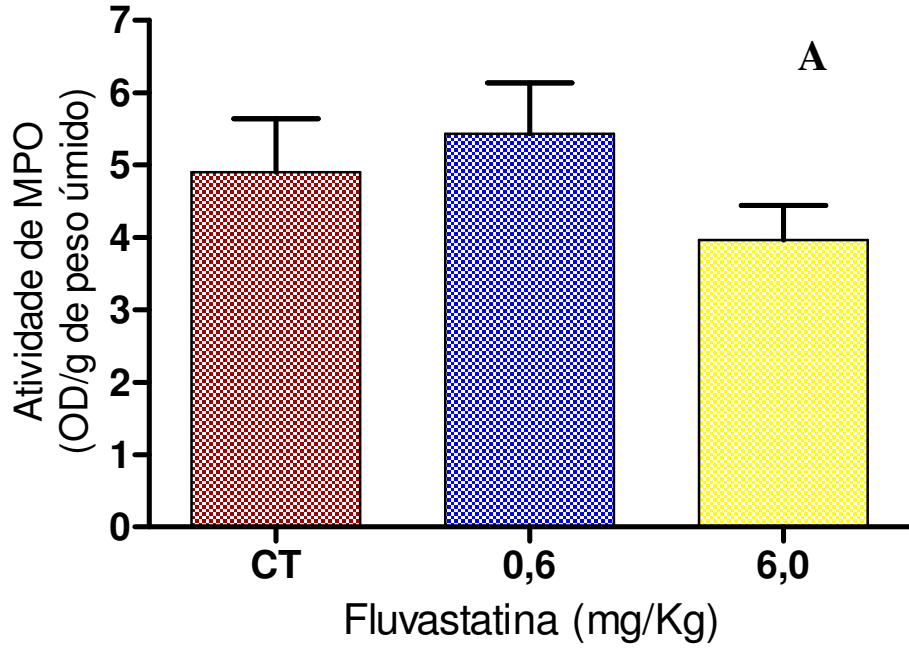
As doses de fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) administradas diariamente via oral aos diferentes grupos de camundongos durante 8 dias reduziu a neovascularização dos implantes do tecido subcutâneo como observado pelas alterações nos conteúdos de hemoglobina (gráfico 11A) e níveis de VEGF dos implantes (um marcador da angiogênese) (gráfico 11B). Os níveis de hemoglobina nos implantes foram  $0,953 \pm 0,13$   $\mu\text{g Hb/mg}$  de peso úmido (controle, n = 5); versus  $0,5 \pm 0,12$  (0,6 mg/kg; n = 5) versus  $0,43 \pm 0,12$  (6 mg/kg; n = 5). A avaliação do VEGF nos implantes mostrou que o tratamento com atorvastatina diminuiu os níveis desta citocina  $0,14 \pm 0,03$  (0,6 mg/kg; n = 6) e  $0,06 \pm 0,007$  (6,0 mg/kg; n = 5) nos implantes tratados comparados ao controle  $0,21 \pm 0,05$ ; n = 5.



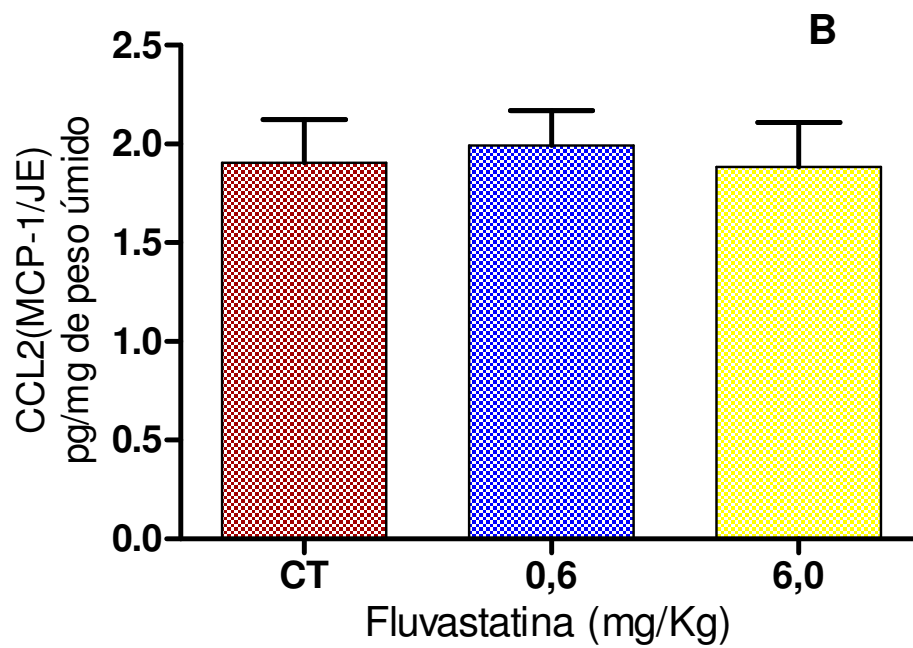
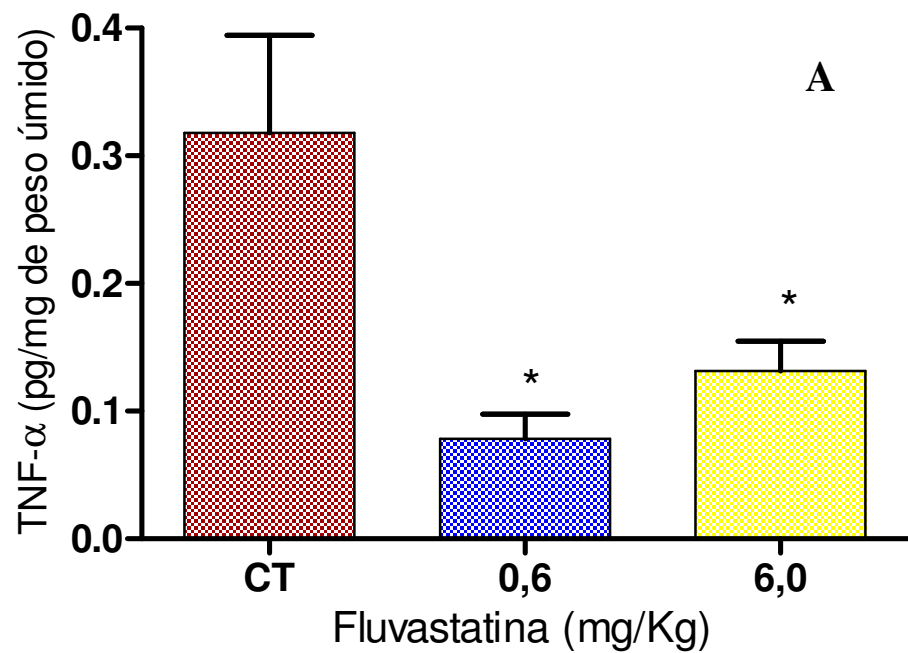
**Gráfico 11:** Efeitos da fluvastatina na angiogênese induzida por implantes de esponja no tecido subcutâneo. Em A o conteúdo de hemoglobina do tecido diminuiu após o tratamento com as doses de 0,6 e 6,0 mg/kg de fluvastatina. Em B redução dos níveis de VEGF pelo tratamento com fluvastatina. CT – controle. Os valores representam as médias ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 5 a 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

#### 4.3.3 – Avaliação da inflamação

Os componentes inflamatórios da inflamação induzida pela esponja no tecido subcutâneo foram determinados pela estimativa do número de leucócitos presentes no implante pela avaliação da atividade de enzimas e níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e CCL2(MCP-1/JE)). O número de neutrófilos (como atividade de MPO) não foi afetado pelo tratamento com fluvastatina  $4,903 \pm 0,73$  (controle; n = 6) versus  $5,436 \pm 0,69$  (0,6 mg/kg; n = 8) e  $3,965 \pm 0,47$  (6,0 mg/kg; n = 6) (gráfico 12A). No entanto, o composto em ambas as doses (0,6 e 6,0 mg/kg) diminuiu a atividade de NAG (número de macrófagos)  $1,232 \pm 0,12$  (controle; n = 6) versus  $0,930 \pm 0,09$  (0,6 mg/kg; n = 7) e  $0,72 \pm 0,17$  (6,0 mg/kg; n = 4) (gráfico 12B) e os níveis de TNF-  $\alpha$   $0,318 \pm 0,07$  (controle; n = 5) versus  $0,079 \pm 0,019$  (0,6 mg/kg; n = 4) e  $0,132 \pm 0,023$  (6,0 mg/kg; n = 4) (gráfico 13A); mas não alterou os níveis de CCL2(MCP-1/JE)  $1,904 \pm 0,21$  (controle, n = 7) versus  $1,993 \pm 0,17$  (0,6 mg/kg; n = 6) e  $1,885 \pm 0,22$  (6,0 mg/kg, n = 6) nos implantes (gráfico 13B).



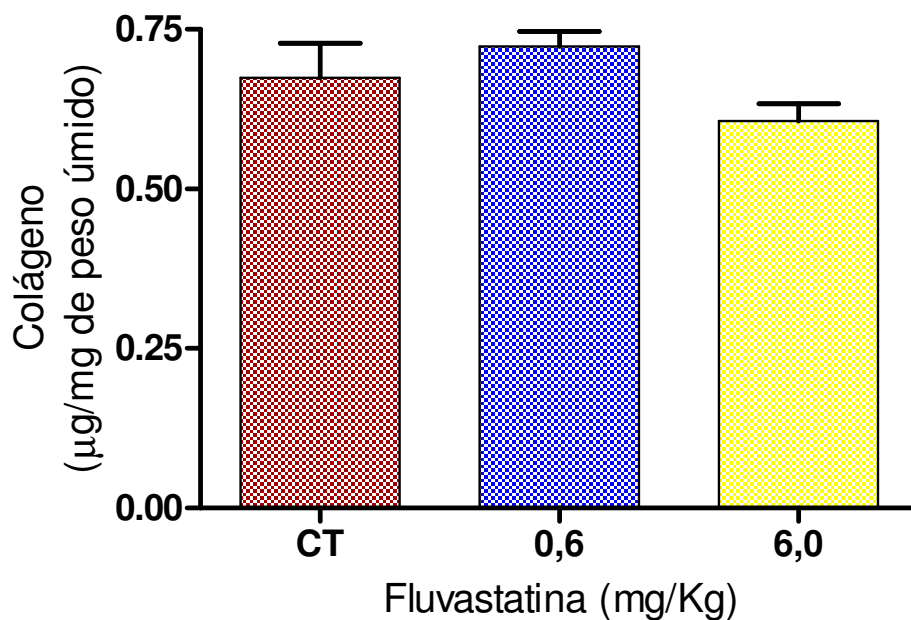
**Gráfico 12:** Efeitos da fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) no infiltrado de células inflamatórias. Acúmulo de neutrófilos (A), acúmulo de macrófagos (B), nos implantes de esponja do tecido subcutâneo. O tratamento não interferiu o infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO), mas diminuiu significativamente o infiltrado de macrófagos (atividade de NAG). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 4 a 8 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.



**Gráfico 13:** Efeitos da fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) nas citocinas inflamatórias. O tratamento diminuiu significativamente os níveis da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  (A) mas não interferiu nos níveis da quimiocina para macrófagos CCL2/MCP-1/JE (B). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 4 a 7 animais.

#### 4.3.4 – Avaliação da deposição de colágeno

A fibrose foi determinada pelo conteúdo de colágeno nos implantes tratados com fluvastatina. O componente fibrogênico não foi alterado pelo tratamento (gráfico 14) em ambas as doses (0,6 e 6,0 mg/kg). A deposição do colágeno intra implante foi de  $0,674 \pm 0,05$  (controle; n = 7) versus  $0,724 \pm 0,02$  (0,6 mg/kg; n = 8) e  $0,607 \pm 0,02$  (6,0 mg/kg; n = 6).

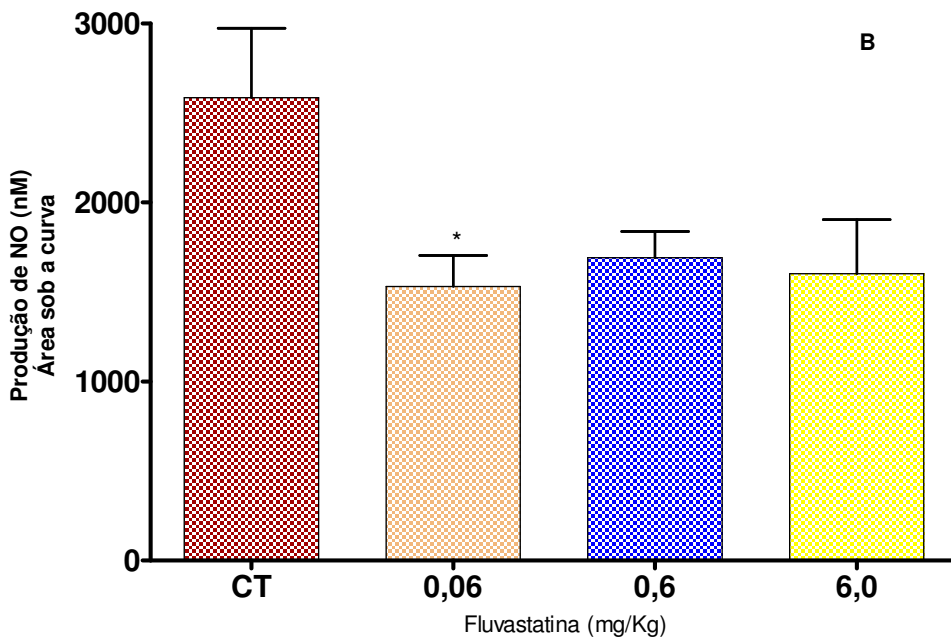
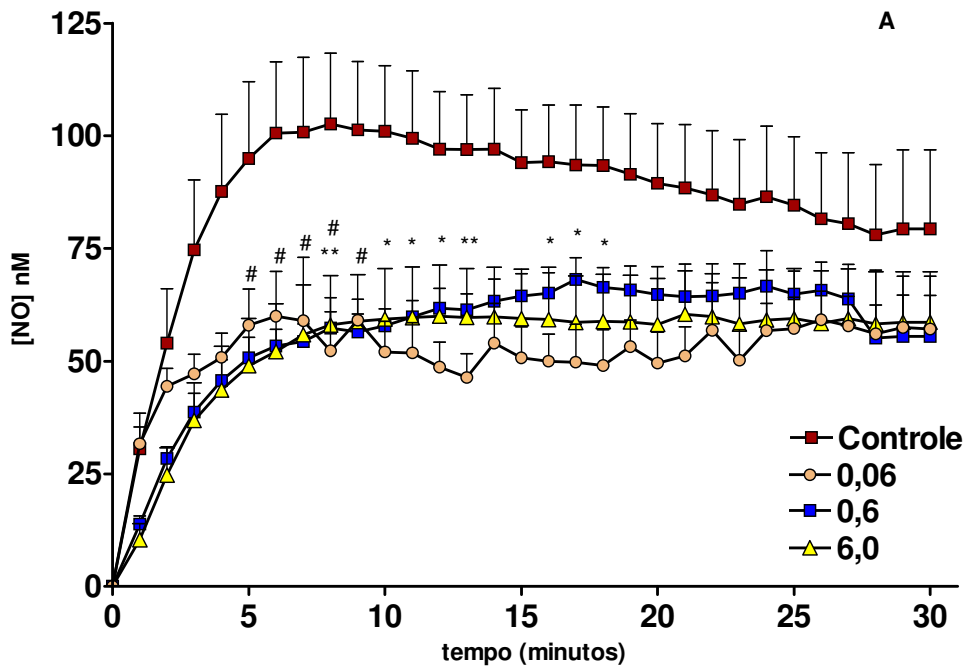


**Gráfico 14:** Efeitos da fluvastatina na deposição de colágeno no implante de esponja subcutâneo. Não houve diminuição na deposição de colágeno em nenhuma das doses (0,6 e 6,0 mg/kg) de fluvastatina. CT - controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 6 a 7 animais.



#### 4.3.5 – Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada pela produção direta no implante de esponja e expressa pela média dos grupos a cada minuto (gráfico 15A) e através área sobre a curva de cada grupo (gráfico 15B). A fluvastatina reduziu a produção de NO no implante subcutâneo nos três grupos tratados, quando avaliada a área sobre a curva, porém significativamente diferente apenas na dose de 0,06 mg/kg ( $1531 \pm 172,2$  N=5); nas doses de 0,6 e 6,0 mg/kg ( $1691 \pm 146,3$  N=5 e  $1602 \pm 302,8$  N=3) comparados ao controle ( $2585 \pm 387,3$  N=5).

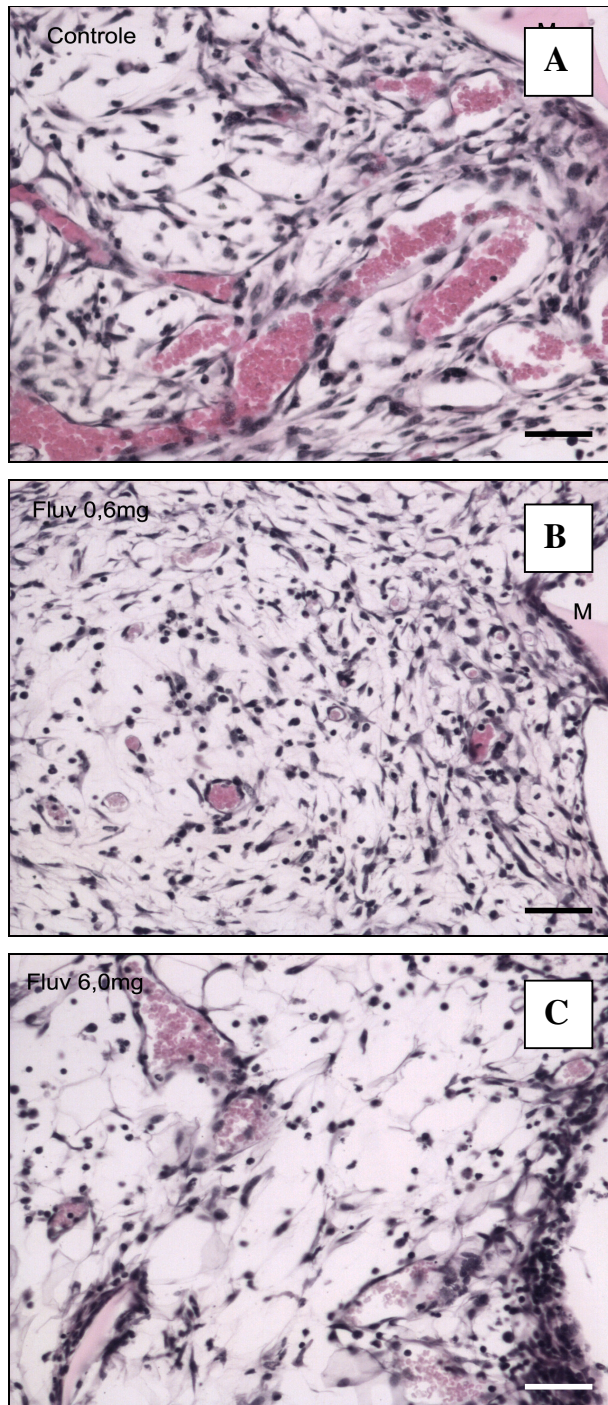


**Gráfico 15:** Efeitos da fluvastatina na produção de NO no implante de esponja subcutâneo. Em (A) produção de NO expressa ao longo de 30 minutos, em (B) área sob a curva. CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 3 a 6 animais. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  para a dose de 0,06 mg/kg; #  $p < 0,05$  para a dose de 0,6 mg/kg, comparados ao grupo controle.

#### **4.4 – Efeito da fluvastatina na angiogênese inflamatória em implantes abdominais**

##### **4.4.1 – Avaliação histológica**

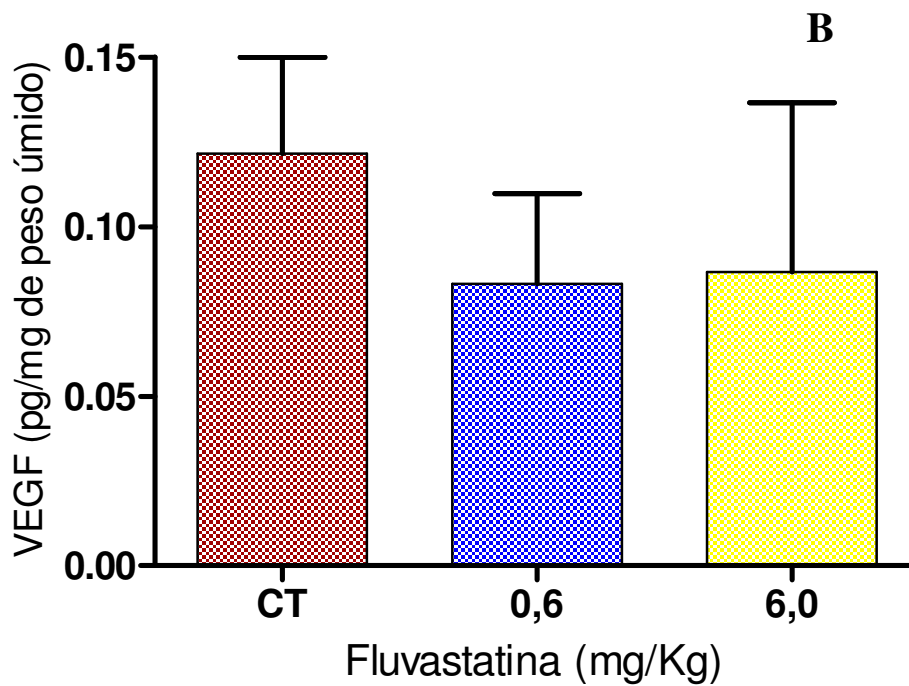
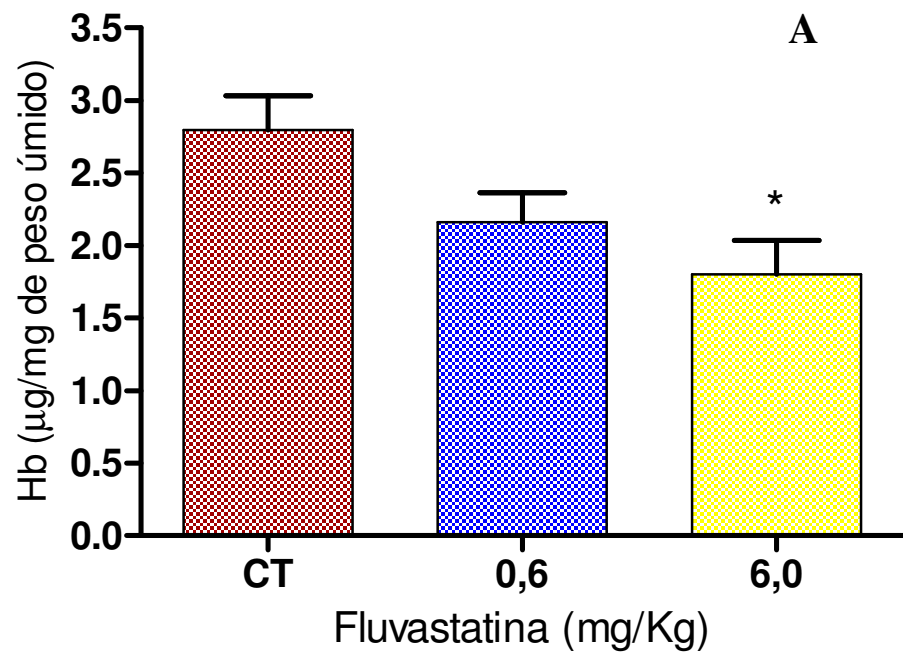
Não foram observados sinais visíveis de infecção ou rejeição nos implantes durante o período de 9 dias do experimento. A implantação abdominal de discos de esponja em camundongos induziu uma resposta de angiogênese inflamatória causando um preenchimento com tecido fibrovascular na matriz sintética. Esse tecido estava vascularizado contendo células inflamatórias, células gigantes multinucleadas e células semelhantes a fibroblastos intercalados com a matriz do implante. O tratamento com a fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) inibiu claramente o tecido fibrovascular e os componentes celulares nos implantes (Figura 6).



**Figura 6:** Cortes histológicos (5  $\mu$ m, corados com H&E) do tecido fibrovascular que infiltra os poros do implante de esponjas abdominal. O tecido recém formado é composto de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. Em (A) o tecido fibrovascular do controle é mais denso e vascularizado comparado com os grupos tratados com fluvastatina nas doses de 0,6 (B) e 6,0 (C) mg/kg. M – Matriz; Barra - 100  $\mu$ m.

#### 4.4,2 – Avaliação da angiogênese

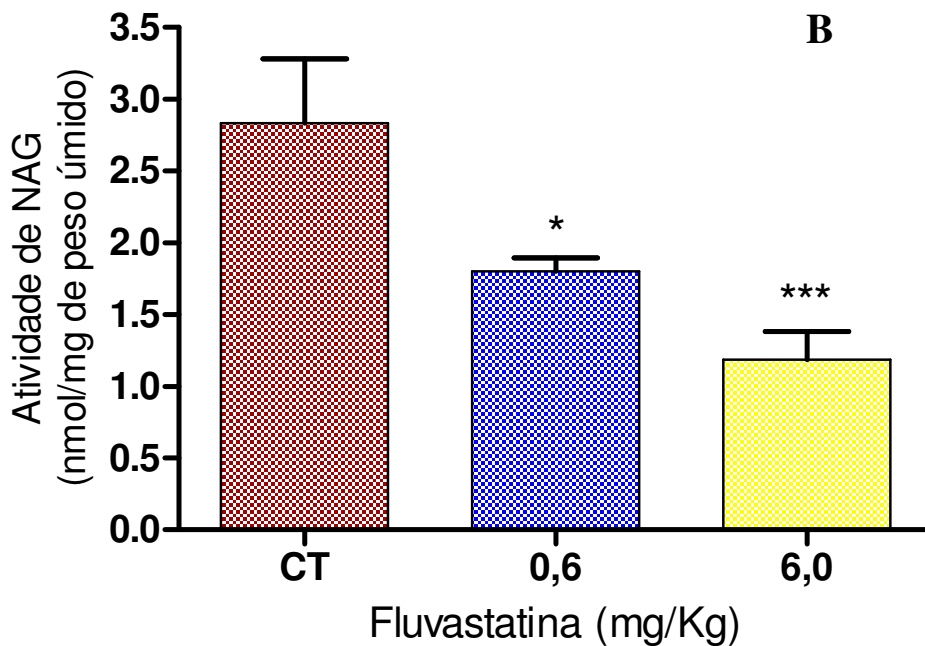
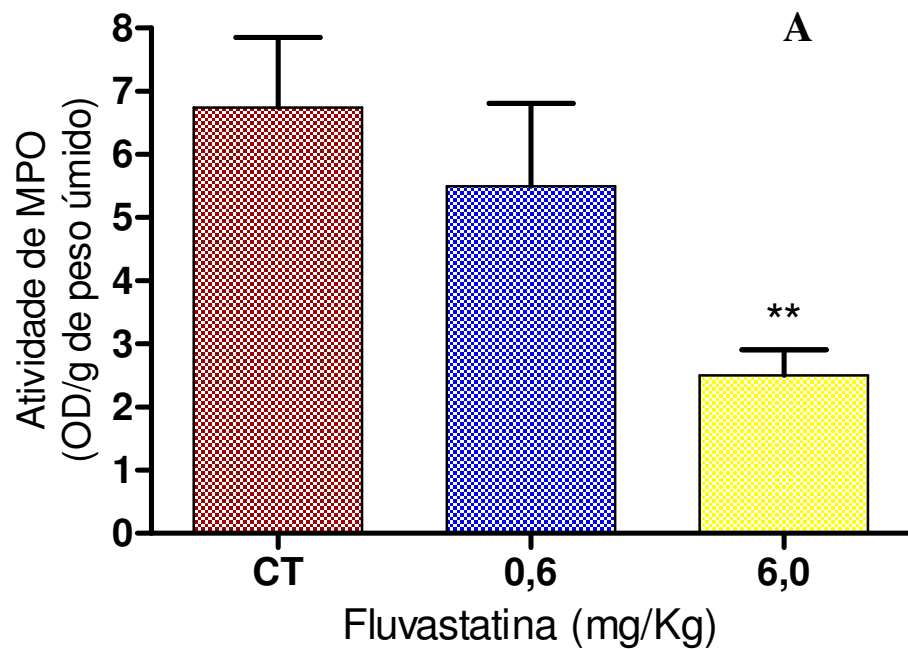
As doses de fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) dadas diariamente via oral aos diferentes grupos de camundongos durante 8 dias reduziu a neovascularização dos implantes do tecido abdominal como observado pelas alterações nos conteúdos de hemoglobina (gráfico 16A) mas não interferiu nos níveis de VEGF dos implantes (gráfico 16B). Os níveis de hemoglobina nos implantes foram  $2,794 \pm 0,23$  (controle, n = 7); versus  $2,160 \pm 0,20$  (0,6 mg/kg; n = 6) versus  $1,802 \pm 0,23$  (6 mg/kg; n = 6). Os níveis de VEGF nos implantes foram de  $0,122 \pm 0,02$  (controle; n = 5); versus  $0,083 \pm 0,026$  (0,6 mg/kg; n = 5) e  $0,087 \pm 0,04$  (6,0 mg/kg; n = 3).



**Gráfico 16:** Efeitos da fluvastatina na angiogênese induzida por implantes de esponja na cavidade abdominal. Em A o conteúdo de hemoglobina do tecido diminuiu após o tratamento com a dose de 6,0 mg/kg de fluvastatina. Em B níveis de VEGF no implante. CT – controle. Os valores representam as médias ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 3 a 7 animais.

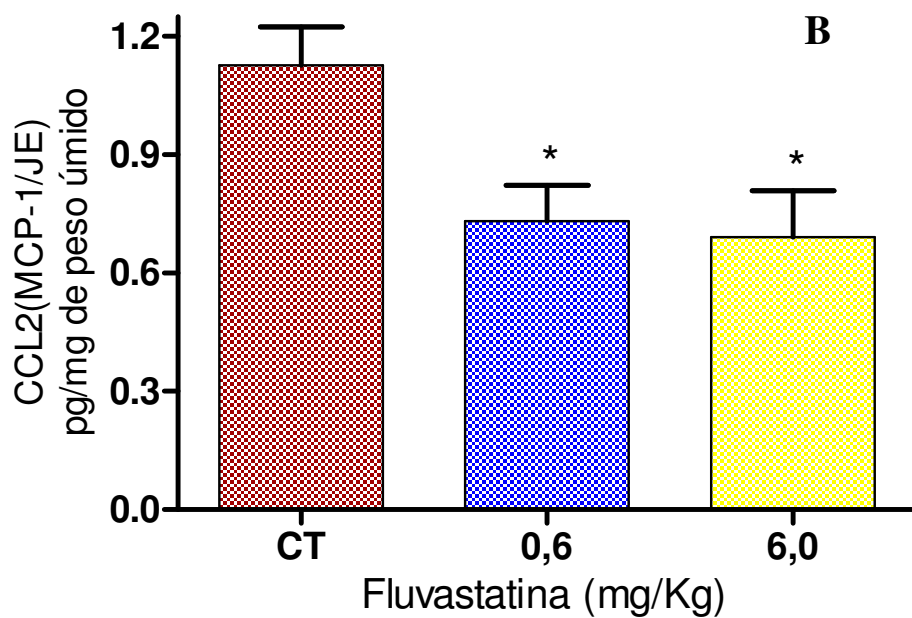
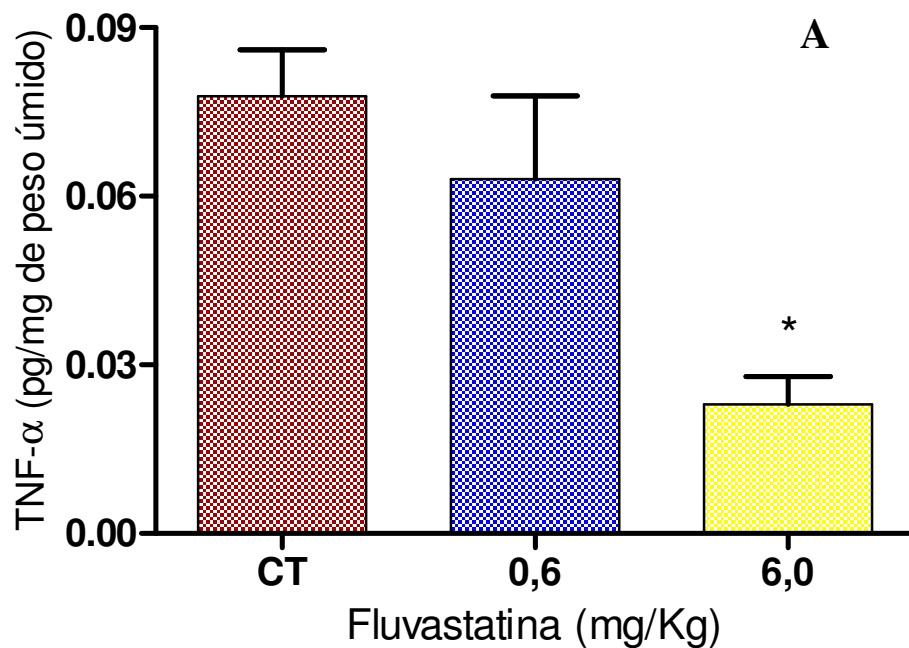
#### 4.4.3 – Avaliação da inflamação

O componente inflamatório do tecido fibrovascular dos implantes abdominais foi determinado pela estimativa do número de leucócitos pela avaliação da atividade de enzimas e níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e CCL2(MCP-1/JE)). A fluvastatina reduziu o componente inflamatório destes implantes em todos os parâmetros avaliados. O número de neutrófilos (como atividade de MPO) foi de  $6,746 \pm 1,104$  (controle; n = 7) versus  $5,494 \pm 1,315$  (0,6 mg/kg; n = 8) e  $2,500 \pm 0,41$  (6,0 mg/kg; n = 6) (gráfico 17A). A redução da atividade de NAG (número de macrófagos) foi de  $2,833 \pm 0,44$  (controle; n = 6) versus  $1,801 \pm 0,09$  (0,6 mg/kg; n = 8) e  $1,184 \pm 0,19$  (6,0 mg/kg; n = 7) (gráfico 17B). A fluvastatina também reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram  $0,078 \pm 0,008$  (controle; n = 5) versus  $0,063 \pm 0,014$  (0,6 mg/kg; n = 6) e  $0,023 \pm 0,004$  (6,0 mg/kg; n = 4) (gráfico 18A); e os níveis de CCL2(MCP-1/JE) foram  $1,127 \pm 0,09$  (controle, n = 6) versus  $0,732 \pm 0,09$  (0,6 mg/kg; n = 6) e  $0,692 \pm 0,11$  (6,0 mg/kg, n = 6) nos implantes (gráfico 18B).



**Gráfico 17:** Efeitos da fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) no infiltrado de células inflamatórias no tecido abdominal. A fluvastatina reduziu o infiltrado de neutrófilos (A), e de macrófagos (B). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 6 a 8 animais. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle.

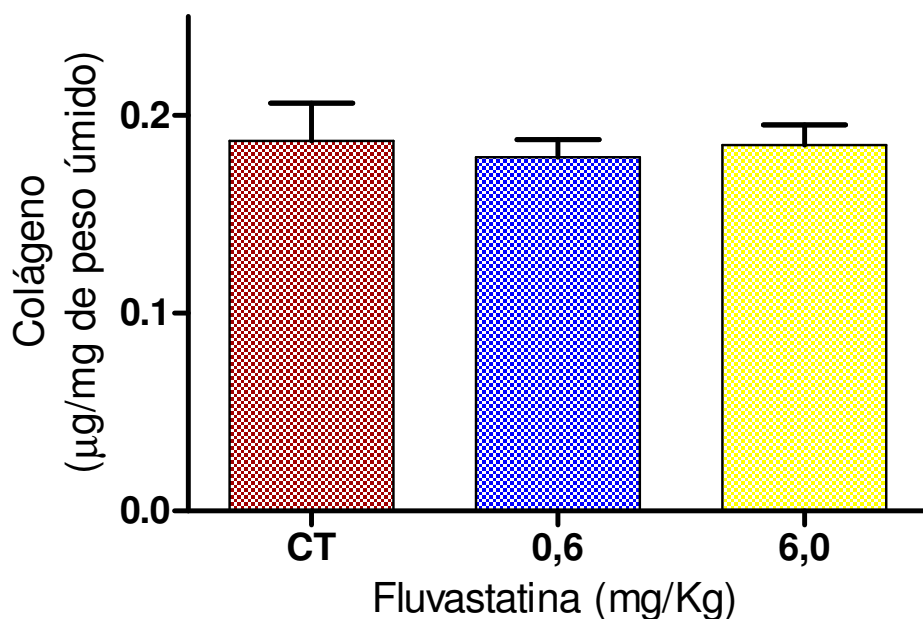




**Gráfico 18:** Efeitos da fluvastatina (0,6 e 6,0 mg/kg) nas citocinas inflamatórias. O tratamento diminuiu significativamente os níveis das citocina inflamatórias TNF- $\alpha$  (A) e da quimiocina para macrófagos CCL2/MCP-1/JE (B). CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 4 a 6 animais.

#### 4.4.4 – Avaliação da deposição de colágeno

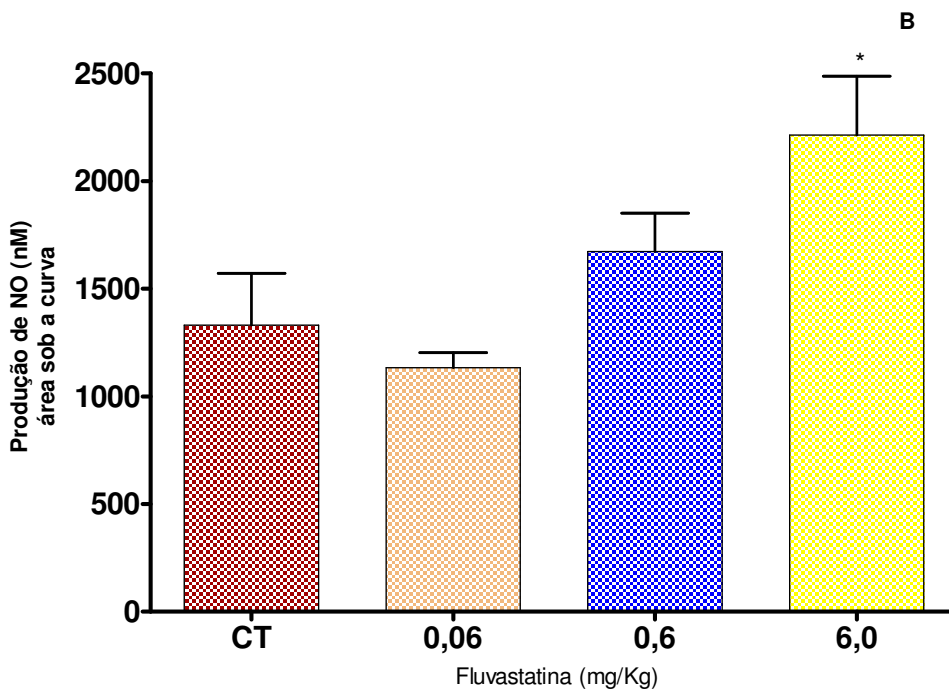
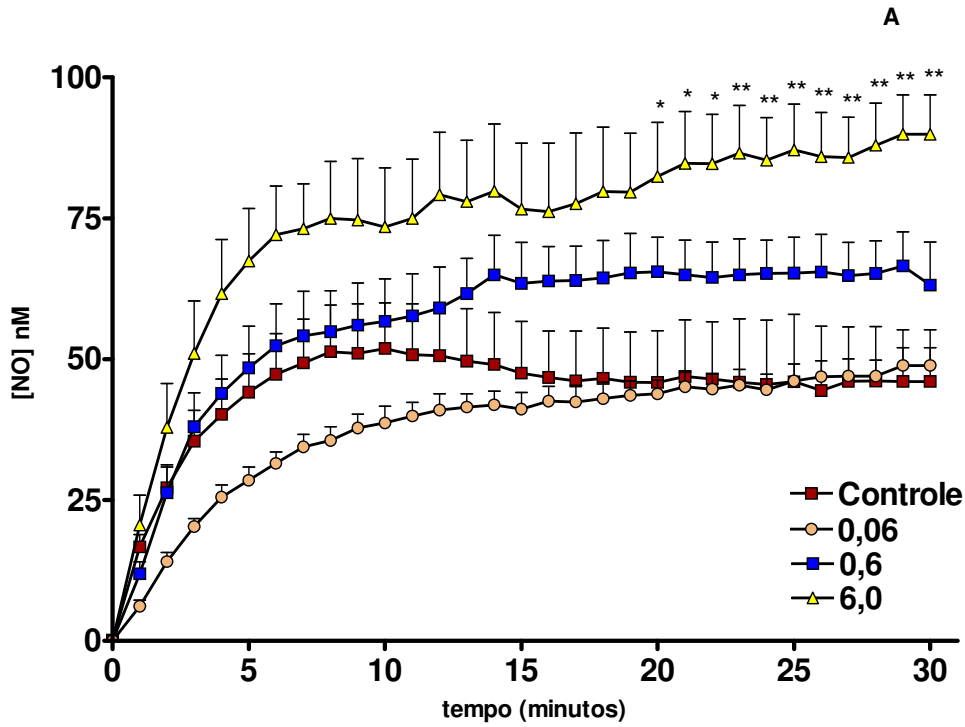
O componente fibrogênico foi determinado pelo conteúdo de colágeno nos implantes abdominais tratados com fluvastatina. A deposição de colágeno não foi alterada pelo tratamento (gráfico 19) em ambas as doses (0,6 e 6,0 mg/kg),  $0,187 \pm 0,01$  (controle; n = 7) versus  $0,179 \pm 0,009$  (0,6 mg/kg; n = 8) e  $0,185 \pm 0,01$  (6,0 mg/kg; n = 8).



**Gráfico 19:** Efeitos da fluvastatina na deposição de colágeno no implante de esponja abdominal. Não houve diminuição na deposição de colágeno em nenhuma das doses (0,6 e 6,0 mg/kg) de fluvastatina. CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 7 a 8 animais.

#### 4.4.5 – Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada pela diretamente no implante de esponja e expressa pela média dos grupos a cada minuto (gráfico 20A) e através da área sob a curva de cada grupo (gráfico 20B). A fluvastatina aumentou a produção de NO no implante abdominal, quando observada a área sobre a curva, na dose de 6,0 mg/kg ( $2274 \pm 273$  N=4) e as doses de 0,06 e 0,6 mg/kg não alteraram significativamente a produção de NO ( $1133 \pm 69$  N=5 e  $1671 \pm 178$  N=7) comparadas ao controle ( $1330 \pm 241,3$  N=6).



**Gráfico 20:** Efeitos da fluvastatina na produção de NO no implante abdominal. Em (A) produção de NO expressa ao longo de 30 minutos, em (B) área sob a curva. CT – controle. Os valores representam a média ( $\pm$  e.p.m) dos grupos de 4 a 7 animais. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  para a dose 0,06 mg/kg comparada ao grupo controle.

#### 4.5 – Resumo dos Resultados

	Atorvastatina						Fluvastatina					
	Subcutâneo		Abdominal				Subcutâneo			Abdominal		
Dose (mg/kg)	0,6	3,0	0,6	3,0	6,0	30	0,06	0,6	6,0	0,06	0,6	6,0
Hb	↓	↓	N	N	N	N	-	↓	↓	-	N	↓
VEGF	↓	↓	N	N	N	N	-	N	↓	-	N	N
NO	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	N	N	↑
MPO	N	N	N	N	N	N	-	N	N	-	N	↓
NAG	↓	↓	N	N	N	N	-	↓	↓	-	↓	↓
TNF- $\alpha$	↓	↓	N	N	N	N	-	↓	↓	-	N	↓
MCP-1	↓	N	N	N	N	N	-	N	N	-	↓	↓
Colágeno	↓	↓	N	N	N	N	-	N	N	-	N	N
TGF- $\beta$ 1	↓	↓	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-

**Quadro 5:** Resumo dos efeitos das estatinas em implantes subcutâneos e abdominais. N Não teve efeito; ↑ estimulou; ↓ inibiu; – não foi avaliado.

## **DISCUSSÃO**

## 5- DISCUSSÃO

Nesse estudo utilizamos um modelo murino de angiogênese inflamatória para avaliar os efeitos das estatinas (atorvastatina e fluvastatina) em componentes chave (angiogênese, inflamação e fibrose) do tecido fibrovascular induzido por implantes sintéticos. Neste modelo, o recrutamento de células inflamatórias, a angiogênese e a deposição de matriz extracelular podem ser modulados por uma série de compostos com potenciais terapêuticos (BELO et al., 2004; ROCHA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007).

As estatinas são inibidores competitivos para a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa um passo limitante da síntese de colesterol que é a redução de HMG-CoA em mevalonato (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005). A inibição dessa enzima leva a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; HUFF & BURNETT, 1997; SCHOONJANS et al., 1999), podendo ser utilizada no tratamento de desordens ateroscleróticas e dislipidêmicas. Além da redução na biossíntese do colesterol, a inibição de mevalonato pelas estatinas também leva a redução na síntese de importantes intermediários, como os isoprenóides FPP e GGPP (GOLDSTEIN & BROWN, 1990). Esses intermediários estão envolvidos na prenilação pós-translacional de várias proteínas, como Ras e Rho, que modulam uma variedade de processos intracelulares incluindo sinalização, diferenciação e proliferação celular (TAKEMOTO & LIAO, 2001; BELLOSTA et al., 2000). Estas proteínas isopreniladas desempenham um papel central na função endotelial, na estabilidade de placas ateroscleróticas, na atividade de plaquetas, na coagulação, na oxidação e nas respostas imunes e inflamatórias (ALEGRET & SILVESTRE, 2007). Deste modo, as estatinas podem exercer múltiplos efeitos benéficos em várias desordens, independente de suas ações clássicas sobre a redução do colesterol (McFARLANE et al., 2002).

Nos experimentos que avaliaram o efeito da atorvastatina em implantes subcutâneos, houve predomínio da atividade inibitória na inflamação, na angiogênese e na fibrogênese do tecido neoformado nas duas doses utilizadas (0,6 e 3,0 mg/kg/dia). Além disso, nosso estudo revelou efeitos inibitórios dessa

estatina em citocinas pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e pró-fibrogênicas presentes no implante de esponja. A avaliação histológica dos implantes de esponja confirmou a eficácia do tratamento na inibição do infiltrado do tecido fibrovascular induzido pela matriz esponjosa em ambas as doses.

Em nossos resultados, o efeito anti-angiogênico foi avaliado pela redução de 54% do conteúdo de hemoglobina e 50% nos níveis de VEGF intra-implante. A angiogênese, formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é um processo complexo que depende da interação de várias moléculas pró e anti-angiogênicas para a formação de vasos funcionais. O VEGF, apesar de ser apenas um componente da complexa resposta angiogênica, é considerado um dos fatores chave envolvidos na angiogênese (YANCOPOULOS et al., 2000). Tem sido reportado que as estatinas podem exercer efeitos diretos na angiogênese, independente de seus efeitos sobre a redução de lipídeos (LI & LOSORDO, 2007). O efeito das estatinas na angiogênese é considerado bifásico e dose-dependente; tendo, portanto, atividades pró e anti-angiogênicas (WEIS et al., 2002; URBICK et al., 2002). Há evidências de que baixas doses induzem efeitos pró-angiogênicos através da ativação de Akt, levando à fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial e produção de óxido nítrico (GOLIGORSKY et al., 1999; KUREISHI et al., 2000; WEIS et al., 2002). O óxido nítrico, por sua vez é conhecido por induzir a angiogênese em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (MENDOZA et al., 2007; FUKUMURA et al., 2006). Por outro lado, altas doses de estatinas irão inibir a síntese de produtos não esteróides do mevalonato, resultando em diminuição na prenilação e na inibição do crescimento celular (WEIS et al., 2002). Além disso, altas doses de estatinas reduzem GGPP, o qual inibe a angiogênese (EDWARDS & ERICSSON, 1999). O GGPP é necessário para a localização na membrana de pequenas proteínas GTP-ligantes como os membros da família Rho (EDWARDS & ERICSSON, 1999). Outros efeitos anti-angiogênicos das estatinas incluem inibição da expressão ou atividade de várias proteínas, por exemplo, CCL2 (MCP-1/JE), metalloproteinase, angiotensina-II, preproendotelina-1 e diminuição da formação de moléculas de adesão (AEPFELBACHER et al., 1997; NICKENIG et al., 1999; HERNANDEZ-PERERA et al., 2000; IKEDA et al., 2000; ROMANO et al., 2000).



Urbich e colaboradores (2002) avaliaram o efeito dose-dependente da atorvastatina na migração de células endoteliais e na angiogênese. Seus resultados mostram que baixas doses de atorvastatina (0,01-0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), as quais se assemelham às concentrações plasmáticas de pacientes em terapia crônica com baixas doses de estatinas, promovem aumento da angiogênese em células endoteliais. Em contraste, altas concentrações de atorvastatina ( $> 0,1 \mu\text{mol/L}$ ) exercem efeito anti-angiogênico por induzir apoptose das células endoteliais. Contudo, Weis e colaboradores (2002) mostraram que os efeitos pró-angiogênicos da atorvastatina ocorreram em concentrações entre 0,005 e 0,01  $\mu\text{mol/L}$  (referente às concentrações de baixas a médias doses em humanos), enquanto que os efeitos anti-angiogênicos foram observados em concentrações entre 0,05 e 1  $\mu\text{mol/L}$  (referente às concentrações de altas doses em humanos). Este mesmo grupo de pesquisadores também avaliou o efeito da atorvastatina *in vivo*, observando o mesmo efeito bifásico em que doses consideradas baixas (0,5 mg/kg) aumentou a angiogênese e aquelas consideradas altas (2,5 mg/kg) inibiram a angiogênese. Em nossos resultados não observamos o efeito bifásico nas doses usadas, pelo menos, em parte, a discrepância observada entre nossos resultados e dos demais pesquisadores, pode ser atribuída a uma série de diferentes fatores, tais como modelos animais, de espécies, via de administração, posologia e duração do tratamento e do experimento.

Os níveis de VEGF no implante após o tratamento com as duas doses de atorvastatina também confirmam os efeitos anti-angiogênicos deste composto, uma vez que esta citocina tem sido apresentada como um mediador essencial da neovascularização, induzindo o crescimento de novos vasos de forma dose-dependente (DVORAK, 2002). A influência da atorvastatina na produção de VEGF pode ser atribuída a efeitos diretos e indiretos das estatinas. Já foi demonstrado que o LDL oxidado intensifica a expressão e produção de VEGF nas células do músculo liso vascular (DULAK et al., 2001a e b). Por consequência, a hipercolesterolemia pode induzir a produção de VEGF em diferentes células incluindo células do músculo liso (DULAK et al., 2001a), macrófagos (RAMOS et al., 1998) ou células endoteliais (INOUE et al., 2001). O tratamento com estatinas, por diminuir os níveis de colesterol, provavelmente interfere na expressão do VEGF dependente de lipídeo. Em

nossos resultados esse mecanismo não parece estar envolvido, pois não observamos alterações nos níveis de colesterol entre os grupos tratados e controle. Assim, o efeito inibidor da atorvastatina sobre a produção de VEGF foi independente de sua atividade na redução de lipídeos. A diminuição da síntese de VEGF pelas estatinas tem sido demonstrada em diferentes tipos celulares, incluindo células tumorais (FELESZKO et al., 1999), células endoteliais (JONES et al., 1999) e células do músculo liso vascular (FRICK et al., 2003; ALBER et al., 2002; DULAK et al., 2001a). Alber e colaboradores (2002) mostraram redução nos níveis de VEGF em pacientes com doença arterial coronariana que receberam tratamento com atorvastatina. Mais recentemente, o tratamento com atorvastatina que resultou em inibição da neovascularização induzida por laser na coróide foi atribuído a baixa produção de VEGF (YAMADA et al., 2007). *In vitro*, os efeitos anti-angiogênicos da atorvastatina foram associados com a diminuição da liberação endotelial de VEGF (WEIS et al., 2002; ALBER et al., 2002). Além de influenciar a síntese de VEGF, a atorvastatina pode interferir em outros mediadores angiogênicos. Dulak e colaboradores (2005) mostraram que a atorvastatina diminui a síntese de uPA e a produção de interleucina-8. A atividade de uPA é necessária para a angiogênese induzida pelo VEGF (HEYMANS et al., 1999) e a IL-8, uma quimiocina gerada em quantidades significativas pelas células endoteliais, é um fator pró-angiogênico e pró-inflamatório, cujos efeitos estão relacionados à sua capacidade quimiotática para células polimorfonucleares (JOZKOWICZ et al., 2001). Portanto, uma possível diminuição desses mediadores pela atorvastatina pode ter contribuído para a atividade anti-angiogênica da atorvastatina observada em nossos resultados.

O componente inflamatório do implante foi avaliado tanto pela atividade de enzimas inflamatórias presentes no implante quanto pelas citocinas TNF- $\alpha$  e CCL2 (MCP-1/JE). A atividade de MPO (representando neutrófilos ativados) não foi afetada pelo tratamento, mostrando ausência de efeito deste composto nesta população de células inflamatórias. No entanto, a atividade de NAG (representando monócitos/macrófagos ativados) foi significativamente diminuída pelo tratamento, uma redução de aproximadamente 80% para as duas doses avaliadas, sugerindo um grau de seletividade da atorvastatina para esta população de células. Como esperado, os níveis de TNF- $\alpha$  e CCL2 (MCP-

1/JE) foram diminuídos (55% e 23% respectivamente) nos grupos tratados com atorvastatina. O efeito das estatinas sobre a resposta inflamatória é bem relatado. É sabido que as estatinas reduzem o risco de eventos coronarianos e podem promover a estabilização de placas ateroscleróticas através de seus efeitos antiinflamatórios (YANG et al., 2006). As estatinas podem influenciar diretamente as funções inflamatórias de células vasculares, imunes, hepatócitos e adipócitos através da ativação de certos mediadores intracelulares ou pela inibição da fosforilação de proteínas quinase das cascatas de segundo-mensageiros intracelular (MONTECUCCO & MARCH, 2009). Enomoto e colaboradores (2009) mostraram o efeito inibidor da rosuvastatina no infiltrado de macrófagos em lesões ateroscleróticas. Além disso, a inibição da HMG-CoA redutase reduz a expressão do receptor da quimiocina CCL2 de monócitos e o recrutamento de monócitos *in vivo* (HAN et al., 2005) e a produção de CCL2 (MCP-1/JE) em modelo de inflamação local induzida por bolsa de ar em ratos (ROMANO et al., 2000), resultados que evidenciam o efeito antiinflamatório das estatinas. As estatinas podem diminuir a inflamação tanto por redução das vias moleculares da resposta pró-inflamatória como pelo aumento daquelas antiinflamatórias (MONTECUCCO & MARCH, 2009). As funções das células imunes (incluindo quimiotaxia, secreção de citocinas e metabolismo oxidativo) são reguladas pela via do mevalonato, principalmente, nas células endoteliais e do músculo liso (BUHAESCU & IZZEDINE, 2007). As pequenas proteínas GTP-ligantes, as quais incluem a superfamília Ras, Rab, Ran e Rho, são moduladas diretamente pela via do mevalonato. Essas proteínas atuam como interruptores “on-off” regulando mudanças do citoesqueleto na adesão, migração e contração celular (NARUMIYA et al., 1997). As estatinas atuam em particular, pela inibição de intermediários isoprenóides da via do mevalonato e Rho (MONTECUCCO & MARCH, 2009). Dentre os estudos que investigaram os efeitos da atorvastatina em doenças inflamatórias, seu uso para inibir a aterosclerose representa o campo mais estudado. Já foi mostrado que a atorvastatina inibe iNOS, quimiocinas, citocinas e expressão de trombospondina-1 em células endoteliais (WAGNER et al., 2002; ZINEH et al., 2006; MARTINEZ-SALES et al., 2007), inibe produção de proteína C reativa (CRP) (ARNAUD et al., 2005) e a expressão de CCL2 (MCP-1/JE) em macrófagos (MONTECUCCO et al., 2009;

TANIMOTO et al., 2008; XU et al., 2003). Yamada e colaboradores (2007) mostraram que a atorvastatina administrada por gavagem nas doses de 10 ou 20 mg/kg/dia, por duas semanas, reduziu o infiltrado de macrófagos e a expressão de CCL2 (MCP-1/JE) em animais com lesão na coróide induzida por laser. O recente trabalho de Furuya e colaboradores (2009) mostrou o efeito antiinflamatório da atorvastatina em camundongos obesos os quais tiveram redução dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e redução do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo desses animais. Os efeitos antiinflamatórios da atorvastatina também foram observados na clínica em pacientes com cardiomiopatia dilatada, os quais após tratamento com 40 mg/dia por 2 semanas e 10 mg/dia por mais 4 meses, tiveram redução significativa de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 (BIELECKA-DABROWA et al., 2009).

A diminuição da deposição de colágeno nos grupos tratados e a redução do nível da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1 ocorreu de forma dose-dependente com redução de 29% (0,6mg/kg) e 47% (3,0mg/kg) para o colágeno e 13% (0,6mg/kg) e 38% (3,0mg/kg) para o TGF- $\beta$ 1, e foram sinais adicionais do efeito inibidor da atorvastatina. O modelo de implantação matriz esponjosa desencadeia uma resposta inflamatória crônica conhecida como reação do tipo corpo estranho, onde um microambiente dinâmico e espacialmente bem organizado é formado. Essa reação é regulada por mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas e metaloproteinases. Esses mediadores promovem ativação celular, angiogênese, extravasamento, migração, fagocitose e finalmente, fibrose (LUTTIKHUIZEN et al., 2006). No início da resposta inflamatória, plaquetas liberam TGF- $\beta$  e mais tardiamente, esta citocina é produzida por macrófagos. O TGF- $\beta$  é um potente ativador e quimiotático de macrófagos, fibroblastos e polimorfonucleares, além de promover a produção e secreção de componentes da matriz extracelular (CROWE et al., 2000). Nessa reação inflamatória crônica, ocorre uma produção abundante de TGF- $\beta$ , o qual estimula células semelhantes aos fibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos, levando assim, à produção excessiva de colágeno, fibronectina e proteoglicanos no implante (TANG & EATON, 1999). O efeito das estatinas sobre a estimulação de fibroblastos e consequente deposição de colágeno tem sido mostrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Kim e colaboradores (2000)

mostraram que a lovastatina reduziu a expressão de TGF- $\beta$ 1 pelas células mesangiais renais de ratos diabéticos. Além disso, as estatinas causam redução do CTGF, um importante intermediário na produção de colágeno e indutor de proteínas da matriz extracelular, em células mesangiais de humanos e ratos normais, bem como de linhagem de fibroblastos renal e pulmonar de pacientes com fibrose. Esses efeitos foram relacionados à redução da geranilgeranil prenilação de Rho (HEUSINGER-RIBEIRO et al., 2004; WATTS et al., 2005; CICHA et al., 2008). Também foi demonstrado que as estatinas diminuíram a celularidade no processo fibrótico por diminuir a mitose e aumentar a apoptose, bem como diminuir os componentes da matriz extracelular (DANESH et al., 2002; TAN et al., 1999; ROMBOOTS et al., 2003). Louneva e colaboradores (2006) mostraram que a sinvastatina inibe a produção de colágeno e reduz a expressão gênica do colágeno em fibroblastos. Estes resultados sugerem que as estatinas têm efeito benéfico em várias desordens fibroproliferativas. Já foi relatado que a atorvastatina reduz o infiltrado de células inflamatórias e a expressão de TGF- $\beta$  em um modelo murino de transplante cardíaco (SHIRAKAWA et al. 2007) e em modelo de disfunção renal provocada por hipertensão (ZHOU, et al., 2008), diminui a produção de CTGF e a produção de colágeno (RUPÉREZ et al., 2007; MARTIN et al., 2005) assim nossos resultados estão de acordo com dados já descritos na literatura.

Os efeitos da atorvastatina nos principais componentes da angiogênese inflamatória em implantes subcutâneos foram independentes da atividade de redução do colesterol, uma vez que não houve alterações significativas nos níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL e triglicédeos.

Os efeitos da atorvastatina também foram avaliados em implantes alojados na cavidade abdominal. Ao contrário dos resultados observados na angiogênese inflamatória induzida pelo implante no espaço subcutâneo, a atorvastatina, nas doses usadas (0,6 e 6,0 mg/kg/dia), não apresentou qualquer alteração nos componentes avaliados no modelo abdominal. De acordo com um trabalho previamente realizado em nosso laboratório, a resposta induzida nesse sítio anatômico acontece de maneira mais intensa que aquela observada no sítio subcutâneo (MENDES et al., 2007). Sendo assim, atribuímos a ausência de efeito da atorvastatina sobre a angiogênese

inflamatória nos implantes abdominais às doses utilizadas. No entanto, mesmo uma dose 5 vezes maior (30 mg/kg/dia) foi ineficaz. Estes resultados se repetiram quando alteramos a via de administração da droga (intraperitoneal) e com o pré-tratamento, mostrando que nesse modelo, com essas doses, duração do tratamento e vias de administração, a atorvastatina não desempenha qualquer efeito sobre os componentes da angiogênese inflamatória neste sítio anatômico. Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos controversos efeitos das estatinas que têm sido mostrados na literatura nos quais, estas drogas apresentam diferentes efeitos de acordo com o tecido e ou célula avaliados, dose utilizada, duração de tratamento, ambiente e tipo de estatinas estudados (DULAK & JÓZKOWICZ, 2005). Recentemente Qi e colaboradores (2009) mostraram que a fluvastatina, mas não a atorvastatina e a sinvastatina (estatinas da mesma família lipofílica), apresentou efeito inibidor sobre a resposta inflamatória. Sendo assim, partindo da idéia de que membros individuais de uma mesma família de estatinas podem influenciar de forma diferente as vias de sinalização da resposta inflamatória dependendo do tipo de órgão, célula, e estímulo, testamos outra estatina (fluvastatina) utilizando o mesmo protocolo inicial da atorvastatina nos espaços subcutâneo e abdominal.

Nossos resultados sobre os efeitos da fluvastatina na angiogênese inflamatória induzida por implantes nos espaços subcutâneo e abdominal, mostraram que esta droga, diferentemente da atorvastatina, apresentou efeito inibidor, sobre os componentes estudados, nos dois sítios avaliados.

A avaliação da fluvastatina em implante subcutâneo e abdominal mostrou que esse composto foi capaz de reduzir a angiogênese e a inflamação, mas não alterou a deposição de colágeno no tecido fibrovascular induzido pelo implante. A angiogênese avaliada através das dosagens de hemoglobina e da citocina VEGF, mostra que a fluvastatina, de modo semelhante à atorvastatina, inibiu a resposta angiogênica nos implantes subcutâneos, pois foi capaz de reduzir de forma significativa em 48% (0,6 mg/kg) e 54% (6,0 mg/kg) o conteúdo de hemoglobina; além de reduzir os níveis de VEGF de forma significativa na maior dose (6,0 mg/kg), uma redução de 71%. E, apesar da menor dose (0,6 mg/kg) não ter apresentado um efeito significativo, a redução foi de 33% nos níveis desta citocina. Esse efeito inibidor

da fluvastatina na angiogênese também foi observado em implantes abdominais.

A resposta inflamatória também foi diminuída por este composto tanto quando avaliamos macrófagos (através da atividade enzimática de NAG) quanto pela redução nos níveis da citocina TNF- $\alpha$ , essa redução foi menos significativa que aquela observada pela atorvastatina. Do mesmo modo que a atorvastatina, o número de neutrófilos (avaliados pela atividade de MPO) não foi alterado pela fluvastatina. No entanto, diferentemente da atorvastatina, a fluvastatina não alterou os níveis de CCL2 (MCP-1/JE). Esses resultados sugerem que no nosso modelo, as estatinas apresentam efeito seletivo para a resposta inflamatória e que a atorvastatina parece ter efeito mais potente nesse sítio inflamatório quando comparada à fluvastatina. Vários estudos mostram o efeito da fluvastatina na redução da função e ativação de células inflamatórias. Estudos *in vitro* mostram os efeitos antiinflamatórios da fluvastatina sobre citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  (WANG et al., 2005), interlerucina-1 $\beta$  e interleucina-6 (INOUE et al., 2000; ITO et al., 2002), diminuição da ativação do fator nuclear kappaB (NF-kB), importante fator de transcrição envolvido na ativação de genes inflamatórios (WANG et al., 2005; HILGENDORFF et al., 2003), além de inibir moléculas de adesão e receptores de membrana em leucócitos e células endoteliais (ROBINSON et al., 2009; HILLYARD et al., 2004 e 2002; NIWA et al., 1996). Estudos *in vivo* mostraram que a fluvastatina reduziu o infiltrado de polimorfonucleares (PMN) em resposta a inflamação aguda mediada pelo sistema complemento no peritônio de camundongos (FISCHETTI et al., 2004), diminuiu citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  em camundongos submetidos a cardiotoxicidade induzida por doxorubicin (RIAD et al., 2009) e em ratos com colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno mas não alterou os níveis de MPO (JAHOVIC et al., 2006), resultados também observados em nossos experimentos. Os efeitos antiinflamatórios da fluvastatina também são observados em humanos; pacientes com síndrome coronariana aguda após tratamento de uma semana com 40 e 80mg/dia apresentaram níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  e proteína C reativa (YANG et al., 2006), pacientes submetidos a hemodiálise que receberam tratamento de fluvastatina 40mg/dia por 4 semanas tiveram níveis de IL-6 e IL-10 diminuídos e aumento no número de receptores para IL-6 (TSIRPANLIS et al., 2004) e

ainda pacientes com doença arterial coronariana pré-tratados com 80mg/dia por três semanas antes de serem submetidos à cirurgia de neovascularização do miocárdio tiveram níveis de P-selectina séricos diminuídos (BERKAN et al., 2009).

A avaliação da deposição de colágeno nos implantes subcutâneo e abdominal dos animais tratados com fluvastatina não mostrou qualquer alteração desse componente, em contraste com o efeito da atorvastatina que reduziu significativamente a deposição de colágeno e os níveis de TGF- $\beta$ 1 em implantes subcutâneos. Os diferentes efeitos das estatinas sobre os mesmos tipos de células foram demonstrados na literatura no trabalho de Nègre-Aminou e colaboradores, 1997, porém *in vitro*. Neste trabalho, foram estudadas diferentes estatinas, em diferentes tipos celulares, e eles observaram que estes compostos podem apresentar diferentes efeitos tanto no que se diz respeito às doses, como no tipo de célula e ainda entre as próprias estatinas.

Um componente importante da resposta angiogênica e inflamatória é o óxido nítrico. Este gás solúvel é produzido não somente pelas células endoteliais como também por macrófagos e neurônios específicos no cérebro (GARCIA & STEIN, 2006). É um importante mediador biológico em vários tecidos promovendo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, regulação da neurotransmissão e defesa natural do sistema imune (ZICHE & MORBIDELLI, 2000). A síntese de NO é realizada pela óxido nítrico sintase (NOS). Existem três diferentes tipos de NOS: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida por citocinas (iNOS). A eNOS e nNOS são expressadas constitutivamente em baixos níveis e são rapidamente ativadas pelo aumento de cálcio citoplasmático na presença de calmodulina. Por outro lado, a iNOS é induzida quando macrófagos são ativados por citocinas e outros agentes e independe do aumento de cálcio intracelular. A ativação de iNOS resulta em uma capacidade de formar maior quantidade de NO que a ativação das NOS constitutivas (GARCIA & STEIN, 2006). Os mecanismos de produção de NO vem sendo amplamente estudados tanto para estimulação como inibição da expressão das NOS. Dentre as drogas que exercem efeitos diferenciados sobre essas enzimas, encontram-se as estatinas.

Nossos resultados mostraram efeitos opostos na produção desta substância nos diferentes sítios estudados. Houve uma redução na produção



de NO nos implantes subcutâneos, e aumento nos implantes abdominais. Como o modelo utilizado gera uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho, é de esperar que no implante de esponja tenha predominância da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Em 1993, Buttery e colaboradores utilizaram o modelo de implantes para avaliar a expressão das NOS em tumores inoculados no implante e observaram que a produção de óxido nítrico não apenas no tumor, mas também no implante sem tumor, era devida a ativação predominante de iNOS. Uma possível explicação para nossos resultados são as diferenças na intensidade do estímulo gerado pelo implante nos espaços subcutâneo e abdominal, o que pode ser observado quando comparamos o número de macrófagos dos grupos controle dos dois sítios: nos implantes subcutâneos a atividade de NAG para o grupo controle foi de  $1,32 \pm 0,12$ ; enquanto que nos implantes abdominais foi de  $2,83 \pm 0,44$ ; representando um aumento de mais de 100% no infiltrado destas células para o implante abdominal. Desse modo, é possível que as doses de fluvastatina utilizadas no modelo subcutâneo de implantes de esponja, tenham sido suficientes para exercer seus efeitos inibidores sobre a iNOS, mas não o bastante para fazê-lo no abdominal. Além do mais, os implantes contidos na cavidade abdominal sofrem infiltração e interferência de diversos tipos celulares deste espaço, além de gerar uma resposta angiogênica mais intensa. O que nos leva a inferir que a produção de NO nesse espaço pode não necessariamente estar vinculada de forma predominante pela iNOS, mas sim pela eNOS, isso explicaria o aumento na produção de NO nesses implantes.

No presente trabalho, mostramos que a atorvastatina e a fluvastatina apresentam potencial inibidor na angiogênese, inflamação e/ou fibrogênese induzida por implante de esponja em camundongos. Estes efeitos são independentes da diminuição sérica de colesterol destas drogas e estão relacionados, principalmente, com a redução dos intermediários isoprenóides da via do mevalonato inibida por estes compostos, com ações diretas e/ou indiretas dos compostos sobre componentes chaves da angiogênese inflamatória como citocinas e óxido nítrico. O principal mérito deste trabalho foi mostrar, pela primeira vez, o efeito destes compostos na angiogênese, inflamação e fibrogênese, de forma concomitante e *in vivo*, utilizando-se doses, modelo animal e duração de tratamento similares. Existe na literatura uma

grande variação nas doses utilizadas, duração do tratamento e dos efeitos das estatinas em diferentes tipos celulares, além das diferenças entre as drogas. Grande parte dos trabalhos avaliou estes componentes de forma isolada e em sua maioria *in vitro*. Estudos *in vitro* têm usado altas concentrações de estatinas, embora doses micromolares possam exercer efeitos significativos nas células estudadas (FRICK et al., 2003; URBICK et al., 2002; WEIS et al., 2002). Outro fator importante é que as concentrações plasmáticas de estatinas em pacientes tratados com estas drogas são de alcances picomolares e nanomolares (DESAGER & HORSMANS, 1996), embora outros estudos tenham demonstrado altas concentrações (WONG et al., 2002). Os diferentes resultados das atividades das estatinas também parecem ser dependentes do tipo e localização da célula (NÈGRE-AMINOU et al., 1997; FRICK et al., 2003; SATA et al., 2004).

Nossos resultados evidenciaram os efeitos, antiinflamatório e anti-angiogênico, da atorvastatina e fluvastatina em processos proliferativos induzidos pelo mesmo estímulo inflamatório em compartimentos anatômicos distintos. Além disso, este estudo mostrou que as estatinas utilizadas exercem efeitos diferenciais na modulação da produção de citocinas e do óxido nítrico. Estes resultados ajudam a entender melhor os diferentes efeitos destes compostos apresentados na literatura e confirmam seus efeitos podem ser benéficos na terapia de diversas patologias que envolvem um ou mais dos componentes aqui avaliados como as desordens cardiovasculares, doenças inflamatórias crônicas, fibroses e câncer.

## **CONCLUSÕES**

## 6 – CONCLUSÕES

Neste trabalho, utilizamos o modelo de implante de esponjas em camundongos para induzir o tecido fibrovascular no espaço subcutâneo e na cavidade abdominal e testar a hipótese de que estatinas poderiam prevenir/atenuar componentes do tecido neoformado.

A atorvastatina e a fluvastatina inibem vários componentes do tecido fibrovascular (recrutamento e ativação de células inflamatórias, neovascularização e deposição de colágeno) induzido por implantes de esponja alojados nos dois compartimentos anatômicos. Os efeitos inibitórios são independentes de suas atividades anti-lipidêmicas.

Os tratamentos utilizados são eficazes em mostrar efeitos diferenciais entre os compostos em componentes da angiogênese inflamatória de implantes sintéticos nos diferentes sítios estudados.

O mecanismo de ação das estatinas na inibição da inflamação e angiogênese é, pelo menos em parte, mediado pelas citocinas VEGF, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e óxido nítrico (NO).

Efeitos opostos da fluvastatina são observados quanto à produção de óxido nítrico (NO) nos implantes subcutâneos e abdominais. Interessantemente, a diminuição do NO em implantes subcutâneos e seu aumento em implantes abdominais resultam em inibição da angiogênese inflamatória.

A diminuição de forma dose-dependente da deposição de colágeno e TGF- $\beta$ 1 pela atorvastatina, mas não pela fluvastatina sugere a seletividade do composto na atividade fibrogênica.

Os tecidos proliferativos apresentam sensibilidade diferencial às estatinas e estas exercem efeitos seletivos dependendo do compartimento anatômico onde o processo patológico se instala.

As funções das estatinas nos múltiplos parâmetros dos componentes da angiogênese inflamatória reveladas neste estudo provêem evidências adicionais do potencial terapêutico destes compostos.

## **REFERÊNCIAS**

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONS, C.B.; COHEN, P.A.; GOWER, A.; REED, K.L.; LEEMAN, S.E.; STUCCHI, A.F.; BECKER, J.M. **Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) decrease postoperative adhesions by increasing peritoneal fibrinolytic activity.** *Ann. Surg.*, v. 245, n. 2, p. 176-184, 2007.

AEPFELBACHER, M.; ESSLER, M.; HUBER, E.; SUGAI, M.; WEBER, P.C. **Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 17, n. 9, p. 1623-1629, 1997.

ALBER, H.F.; DULAK, J.; FRICK, M.; DICHTL, W.; SCHWARZACHER, S.P.; PACHINGER, O.; WEIDINGER, F. **Atorvastatin decreases vascular endothelial growth factor in patients with coronary artery disease.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 39, n. 12, p. 1951-1955, 2002.

ALBERTS, A.W.; CHEN, J.; KURON, G.; HUNT, V.; HUFF, J.; HOFFMAN, C.; ROTHROCK, J.; LOPEZ, M.; JOSHUA, H.; HARRIS, E.; PATCHETT, A.; MONAGHAN, R.; CURRIE, S.; STAPLEY, E.; ALBERS-SCHONBERG, G.; HENSENS, O.; HIRSHFIELD, J.; HOOGSTEEN, K.; LIESCH, J.; SPRINGER, J. **Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 77, n. 7, p. 3957-3961, 1980.

ALEGRET, M. & SILVESTRE, J.S. **Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches.** *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v. 28, n. 9, p. 627-36, 2007.

ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. **Quantitative *in-vivo* studies on angiogenesis in a rat sponge model.** *Br. J. Exp. Path.*, v. 68, n. 6, p. 755-766, 1987.

ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; BELO, A.B.; TARSO, A.M.; BERALDO, W.T. **Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method.** *Microvasc. Res.*, v. 54, n. 3, p. 253-261, 1997.

ANDRADE, S.P.; VIEIRA, L.B.G.B.; BAKHLE, Y.S.; PIPER, P.J. **Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse.** *Br. J. Exp. Path.*, v. 73, n. 4, p. 503-513, 1992.

AREMBERG, D.A.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; SHANAFELT, A.; STRIETER, R.M. **In vitro and in vivo systems to assess role of CXC chemokines in regulation of angiogenesis.** *Methods Enzymol.*, v. 288, p. 190-220, 1997.

ARNAUD, C.; BURGER, F.; STEFFENS, S.; VEILLARD, N.R.; NGUYEN, T.H.; TRONO, D.; MACH, F. **Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 25, n. 6, p. 1231-1236, 2005.

ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M. **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO J.*, v. 18, n. 14, p. 3964–3972, 1999.

AUSPRUNK, D.H. & FOLKMAN, J. **Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.** *Microvasc. Res.*, v. 14, n. 1, p. 53-65, 1977.

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

BAKRI, R.; WANG, J.; WIERZBICKI, A.S.; GOLDSMITH, D. **Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure.** *Int. J. Cardiol.*, v. 91, n. 1, p. 107-109, 2003.

BELLOSTA, S.; FERRI, N.; BERNINI, F.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. **Non-lipid-related effects of statins.** *Ann. Med.*, v. 32, n. 3, p. 164-176, 2000.

BELO, A.V., BARCELOS, L.S., TEIXEIRA, M.M., FERREIRA, M.A., ANDRADE, S.P. **Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice.** *Cancer Invest.*, v. 22, n. 5, p. 723-729, 2004.

BENELLI, R.; LORUSSO, G.; ALBINI, A.; NOONAN, D.M. **Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, n. 24, p. 3101-3115, 2006.

BERKAN, O.; KATRANCIOGLU, N.; OZKER, E.; OZERDEM, G.; BAKICI, Z.; YILMAZ, M.B. **Reduced P-selectin in hearts pretreated with fluvastatin: a novel benefit for patients undergoing open heart surgery.** *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 57, n. 2, p. 91-95, 2009.



BIELECKA-DABROWA, A.; GOCH, J.H.; MIKHAILIDIS, D.P.; RYSZ, J.; MACIEJEWSKI, M.; BANACH, M. **The influence of atorvastatin on parameters of inflammation and function of the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy.** *Med. Sci. Monit.*, v. 15, n. 12, p. MS12-23, 2009.

BOCK, O. & MROWIETZ, U. **Keloids. A fibroproliferative disorder of unknown etiology.** *Hautarzt.*, v. 53, n.8, p. 515-523, 2002.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** *J. Invest. Dermatol.*, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. **The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.** *Cell.*, v. 89, n. 3, p. 331-340, 1997.

BUHAESCU, I. & IZZEDINE, H. **Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications.** *Clin. Biochem.*, v. 40, n. 9-10, p. 575-584, 2007.

BUTTERY, L.D.; SPRINGALL, D.R.; ANDRADE, S.P.; RIVEROS-MORENO, V.; HART, I.; PIPER, P.J.; POLAK, J.M. **Induction of nitric oxide synthase in the neovasculature of experimental tumours in mice.** *J. Pathol.*, v. 171, n. 4, p.311-319, 1993.

CAMPOS, P.P., ANDRADE, S.P., MORO, L., FERREIRA, M.A., VASCONCELOS, A.C. **Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice.** *Histol Histopathol.*, v. 21, n. 12, p. 1263-1270, 2006.

CARMELIET, P. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** *Nat. Med.*, v. 6, n. 3, p. 389-395, 2000.

CARMELIET, P. **Angiogenesis in life, disease and medicine.** *Nat.*, v. 438, n. 7070, p. 932-936, 2005.

CARMELIET, P. & JAIN, R.K. **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nat.*, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.

CHANG, C. & WERB, Z. **The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.** *Trends in Cell. Biol.*, v. 11, n. 11, p. S37-S43, 2001.

CHARO, I.F. & RANSOHOFF, R.M. **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.** *N. Engl. J. Med.*, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

CHARO, I.F. & TAUBMAN, M.B. **Chemokines in the pathogenesis of vascular disease.** *Circ. Res.*, v. 95, n. 9, p. 858-866, 2004.

CHEN, H.; IKEDA, U.; SHIMPO, M.; IKEDA, M.; MINOTA, S.; SHIMADA, K. **Fluvastatin upregulates inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells.** *Hypertension*, v. 36, n. 6, p. 923-928, 2000.

CICHA, I.; GOPPELT-STRUEBE, M.; MUEHLICH, S.; YILMAZ, A.; RAAZ, D.; DANIEL, W.G.; GARLICH, C.D. **Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress.** *Atheroscl.*, v. 196, n. 1, p. 136-145, 2008.

CLARK, R.A. **Fibrin and wound healing.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 936, p. 355-367, 2001.

CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. **Molecular mechanisms of blood vessel growth.** *Cardiovasc. Res.*, v. 49, n. 3, p. 507-521, 2001.

CORSINI, A.; MAGGI, F.M.; CATAPANO, A.L. **Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase.** *Pharmacol. Res.*, v. 31, n. 1, p. 9-27, 1995.

COSTA, C.; SOARES, R.; SCHMITT, F. **Angiogenesis: now and then.** *APMIS.*, v. 112, n. 7-8, p. 402-412, 2004.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. **Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?** *Angiog.*, v. 10, n. 3, p. 149-166, 2007.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Reparo dos tecidos: Crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas.** In: *ROBBINS - Patologia estrutural e funcional*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 79-100.

COUSSERS, L. & WERB, Z. **Inflammation and cancer.** *Nat.*, v. 420, n. 6927, p. 860-867, 2002.

CROWE, M.J.; DOETSCHAMAN, T.; GREENHALGH, D.G. **Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta1 knockout mice.** *J. Invest. Dermatol.*, v. 115, n. 1, p. 3-11, 2000.

D'AMORE, P.A. & THOMPSON, R. **Mechanisms of angiogenesis.** *Ann. Rev. Physiol.*, v. 49, p. 453-464, 1987.

DANESH, F.R.; SADEGHI, M.M.; AMRO, N.; PHILIPS, C.; ZENG, L.; LIN, S.; SAHAI, A.; KANWAR, Y.S. **3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, n. 12, p. 8301-8305, 2002.

DAVIDSON, J.M. & BENN, S.I. **Regulation of angiogenesis and wound repair: Interactive role of the matrix and growth factors.** In: *SIRICA, A.E. Cellular and molecular pathogenesis. USA: Lippincott-Raven publishers*, 1996, p. 79-107.

DESAGER, J.P. & HORSMANS, Y. **Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors.** *Clin. Pharmacokinet*, v. 31, n. 5, p. 348-371, 1996.

DESMOULIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** *Am. J. Pathol.*, v. 146, n.1, p. 56-66, 1995.

DIEGELMANN, R.F. **Analysis of collagen synthesis.** *Meth. Mol. Med.*, v. 78, p. 349-358, 2003.

DIEGELMANN, R.F. & EVANS, M.C. **Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.** *Front. Biosci.*, v. 9, p. 283-289, 2004.

DISTLER, J.W.; HIRTH, A.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; GAY, R.E.; GAY, S.; DISTLER, O. **Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.** *Q. J. Nucl. Med.*, v. 47, n. 3, p. 149-161, 2003.

DUFFIELD, J.S. **The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde.** *Clin. Sci. (Lond)*, v. 104, n. 1, p. 27-38, 2003.

DULAK, J.; LOBODA, A.; JAZWA, A.; ZAGORSKA, A.; DÖRLER, J.; ALBER, H.; DICHTL, W.; WEIDINGER, F.; FRICK, M.; JOZKOWICZ, A. **Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells.** *Endoth.*, v. 12, n. 5-6, p. 233-241, 2005.

DULAK, J. & JÓZKOWICZ, A. **Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy.** *Curr. Cancer. Drugs. Targets.*, v. 5, n. 8, p. 579-594, 2005.

DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A.; DICHTL, W.; ALBER, H.; SCHWARZACHER, S.P.; PACHINGER, O.; WEIDINGER, F. **Vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells is enhanced by 7-ketocholesterol and lysophosphatidylcholine independently of their effect on nitric oxide generation.** *Atheroscl.*, v. 159, n. 2, p. 325-332, 2001a.

DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A.; FRICK, M.; ALBER, H.F.; DICHTL, W.; SCHWARZACHER, S.P.; PACHINGER, O.; WEIDINGER, F. **Vascular endothelial growth factor: angiogenesis, atherogenesis or both?** *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 38, n. 7, p. 2137-2138, 2001b.

DVORAK, H.F. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy.** *J. Clin. Oncol.*, v. 20, n. 21, p. 4368-80, 2002.

EDWARDS, P.A. & ERICSSON, J. **Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway.** *Annu. Rev. Biochem.*, v. 68, p. 157-185, 1999.

EHRlich, H.P. & KRUMMEL, T.M. **Regulation of wound healing from a connective tissue perspective.** *Wound Repair Regen.*, v. 4, n. 2, p. 203-210, 1996.

ENDO, A. **The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors.** *J. Lipid. Res.*, v. 33, n. 11, p. 1569-1582, 1992.

ENOMOTO, S.; SATA, M.; FUKUDA, D.; NAKAMURA, K.; NAGAI, R. **Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice.** *Biomed. Pharmacother.*, v. 63, n. 1, p. 19-26, 2009.

FELESZKO, W.; BALKOWIEC, E.Z.; SIEBERTH, E.; MARCZAK, M.; DABROWSKA, A.; GIEMASZ, A.; CZAJKA, A.; JAKOBISIAK, M. **Lovastatin and tumor necrosis factor-alpha exhibit potentiated antitumor effects against Ha-ras-transformed**

**murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis.** *Int. J. Cancer.*, v. 81, n. 4, p. 560-567, 1999.

FERON, O.; DESSY, C.; DESAGER, J.P.; BALLIGAND, J.L. **Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance.** *Circul.*, v. 103, n. 1, p. 113-118, 2001.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat. Med.*, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.

FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M.M.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. **Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF).** *Life Sci.*, v. 81, n. 3, p. 210-217, 2007.

FISCHETTI, F.; CARRETTA, R.; BOROTTO, G.; DURIGUTTO, P.; BULLA, R.; MERONI, P.L.; TEDESCO, F. **Fluvastatin treatment inhibits leucocyte adhesion and extravasation in models of complement-mediated acute inflammation.** *Clin. Exp. Immunol.*, v. 135, n. 2, p. 186-193, 2004.

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

FOLKMAN, J. & GREENSPAN, H.P. **Influence of geometry on control of cell growth.** *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 417, n. 3-4, p. 211-231, 1975.

FOLKMAN, J. & KLAGSBRUN, M. **Angiogenic factors.** *Sci.*, v. 235, n. 4787, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J. & BREM, H. **Angiogenesis and inflammation.** in J.I. Gallin, I.M. Goldstein and R. Snyderman. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2ed. Raven Press, Ltd., New York*, 1992, p 821-839.

FOLKMAN, J. & SHING, Y. **Angiogenesis.** *J. Biol Chem.* v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M.; SASSE, J.; WADZINSKI, M.; INGBER, D.; VLODAVSKY, I. **A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor is stored in the basement membrane.** *Am. J. Pathol.*, v. 130, n. 2, p. 393-400, 1988.

FUKUMURA, D., KASHIWAGI, S., JAIN, R.K. **The role of nitric oxide in tumour progression.** *Nat Rev Cancer.*, v. 6, n. 7, p. 521-534, 2006.

FURUYA, D.T.; POLETTO, A.C.; FAVARO, R.R.; MARTINS, J.O.; ZORN, T.M.T.; MACHADO, U.F. **Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice.** *Metabolism*, 2009. (in press).

FRICK, M.; DULAK, J.; CISOWSKI, J.; JÓZKOWICZ, A.; ZWICK, R.; ALBER, H.; DICHTL, W.; SCHWARZACHER, S.P.; PACHINGER, O.; WEIDINGER, F. **Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells.** *Atherosclerosis*, v. 170, n. 2, p. 229-36, 2003.

GARCIA, X. & STEIN, F. **Nitric oxide.** *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, v. 17, n. 2, p. 55-57, 2006.

GERBER, H.P.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B.A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. **Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.** *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 46, p. 30336–30343, 1998a.

GERBER, H.P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. **Vascular endothelial growth factor induced expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.** *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 21, p. 13313–13316, 1998b.

GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. **Regulation of the mevalonate pathway.** *Nat.*, v. 343, n. 6257, p. 425-430, 1990.

GOLIGORSKY, M.S.; BUDZIKOWSKI, A.S.; TSUKAHARA, H.; NOIRI, E. **Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 26, n. 3, p. 269-271, 1999.

GOPPELT-STREBE, M.; HAHN, A.; IWANCIW, D.; REHM, M.; BANAS, B. **Regulation of connective tissue growth factor (ccn2; ctgf) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins).** *Mol. Pathol.*, v. 54, n. 3, p. 176-179, 2001.

GREENHALGH, D.V. **The role of growth factors in wound healing.** *J. Traum.*, v. 41, n. 1, p. 159-167, 1996.

GRIFFIOEN, A.W. & MOLEMA, G. **Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation.** *Pharmacol. Rev.*, v. 52, n. 2, p. 237-268, 2000.

GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. **Plastic sponge which acts as a framework for living tissue.** *AMA Arch. Surg.*, v. 63, n. 3, p. 288-297, 1951.

HALL, M.C.; YOUNG, D.A.; WATERS, J.G.; ROWAN, A.D.; CHANTRY, A.; EDWARDS, D.R.; CLARK, I.M. **The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1.** *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 12, p. 10304-10313, 2003.

HAN, K.H.; RYU, J.; HONG, K.H.; KO, J.; PAK, Y.K.; KIM, J.B.; PARK, S.W.; KIM, J.J. **HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo.** *Circulation*, v. 111, n. 11, p. 1439-1447, 2005.

HASLINGER, B.; GOEDDE, M.F.; TOET, K.H.; KOOISTRA, T. **Simvastatin increases fibrinolytic activity in human peritoneal mesothelial cells independent of cholesterol lowering.** *Kidney Int.*, v. 62, n. 5, p. 1611-1619, 2002.

HASLINGER, B.; KLEEMANN, R.; TOET, K.H.; KOOISTRA, T. **Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated human peritoneal mesothelial cells.** *Kidney Int.*, v. 63, n. 6, p. 2065-2074, 2003.

HAUSDING, M.; WITTECK, A.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; VON EICHELSTREIBER, C.; FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. **Inhibition of small G proteins of the rho family by statins or clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II.** *Br. J. Pharmacol.*, v. 131, n. 3, p. 553-561, 2000.

HEIL, M.; EITENMÜLLER, I.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W. **Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences.** *J. Cell. Mol. Med.*, v. 10, n. 1, p. 45-55, 2006.

HERNANDEZ-PERERA, O.; PEREZ-SALA, D.; SORIA E.; LAMAS, S. **Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells.** *Circ. Res.*, v. 87, n. 7, p. 616-622, 2000.

HEUSINGER-RIBEIRO, J.; FISCHER, B.; GOPPELT-STRUEBE, M. **Differential effects of simvastatin on mesangial cells.** *Kidney Int.*, v. 66, n. 1, p. 187-195, 2004.

HEYMANS, S.; LUTTUM, A.; NUYENS, D.; THEILMEIER, G.; CREEMERS, E.; MOONS, L.; DYSPERSIN, G.D.; CLEUTJENS, J.P.; SHIPLEY, M.; ANGELLILO, A.; LEVI, M.; NUBE, O.; BAKER, A.; KESHET, E.; LUPU, F.; HERBERT, J.M.; SMITS, J.F.; SHAPIRO, S.D.; BAES, M.; BORGERS, M.; COLLEN, D.; DAEMEN, M.J.; CARMELIET, P. **Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure.** *Nat. Med.*, v. 5, n. 10, p. 1135-1142, 1999.

HILGENDORFF, A.; MUTH, H.; PARVIZ, B.; STAUBITZ, A.; HABERBOSCH, W.; TILLMANN, H.; HOLSHERMANN, H. **Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes.** *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 41, n. 9, p. 397-401, 2003.

HILLYARD, D.Z.; CAMERON, A.J.; McINTYRE, A.H.; HADDEN, M.H.; MARSHLL, H.E.; JOHNSTON, N.; JARDINE, A.G. **Inhibition of proliferation and signaling mechanisms in human lymphocytes by fluvastatin.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 29, n. 8, p. 673-678, 2002.

HILLYARD, D.Z.; JARDINE, A.G.; McDONALD, K.J.; CAMERON, A.J. **Fluvastatin inhibits raft dependent Fcgamma receptor signaling in human monocytes.** *Atheroscl.* v. 172, n. 2, p. 219-228, 2004.

HINZ, B. **Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.** *J Invest. Dermatol.*, v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.

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

HORTON, J.D. & SHIMOMURA, I. **Sterol regulatory element-binding proteins: Activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis.** *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 10, n. 2, p. 143-150, 1999.



HU, D.E.; HILEY, C.R.; SMITHER, R.L.; GRESHAM, G.A.; FAN, T.P. **Correlation of <sup>133</sup>Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers.** *Lab. Invest.*, v. 72, n. 5, p.601-10, 1995.

HUFF, M.W. & BURNETT, J.R. **3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion.** *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 8, n. 3, p. 138-145, 1997.

HUNT, T. K.; KNIGHTON, D. R.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W.H.<sup>3rd</sup>; ANDREWS, W.S. **Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages.** *Surgery*, v. 96, n. 1, p. 48-54, 1984.

IGEL, M.; SUDHOP, T.; VON BERGMANN, K. **Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin.** *J. Clin. Pharmacol.*, v. 42, n. 8, p. 835-845, 2002.

II, M. & LOSORDO, D.W. **Statins and the endothelium.** *Vascul. Pharmacol.*, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2007.

IKEDA, U.; SHIMPO, M.; OHKI R.; INABA, H.; TAKAHASHI, M.; YAMAMOTO, K.; SHIMADA, K. **Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells.** *Hypertension*, v. 36, n. 3, p. 325-329, 2000.

INGBER, D.E.; MADRI, J.A.; FOLKMAN, J. **A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution.** *Endocrinology*, v. 119, n. 4, p. 1768-75, 1986.

INOUE, I.; GOTO, S.; MIZOTANI, K.; AWATA, T.; MASTUNAGA, T.; KAWAI, S.; NAKAJIMA, T.; HOKARI, S.; KOMODA, T.; KATAYAMA, S. **Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells.** *Life Sci.*, v. 67, n. 8, p. 863-876, 2000.

INOUE, M.; ITOH, H.; TANAKA, T.; CHUN, T.H.; DOI, K.; FUKUNAGA, Y.; SAWADA, N.; YAMSHITA, J.; MASATSUGU, K.; SAITO, T.; SAKAGUCHI, S.; SONE, M.; YAMAHARA, K.I.; YURUGI, T.; NAKAO, K. **Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.** *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* v. 21, p. 560-566, 2001.

ISTVAN, E.S. & DEISENHOFER, J. **Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase.** *Science*, v. 292, n. 5519, p. 1160-1164, 2001.

ITO, T.; IKEDA, U.; SHIMPO, M.; OHKI, R.; TAKAHASHI, M.; YAMAMOTO, K.; SHIMADA, K. **HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells.** *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, v. 16, n. 2, p. 121-126, 2002.

JACKSON, J.R.; BOLOGNESE, B.; KIRCHER, C.H.; MARSHALL, L.A.; WINKLER, J.D. **Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation.** *Inflamm. Res.*, v. 46, n. 2 Suppl, p. S129-30, 1997.

JAHOVIC, N.; GEDIK, N.; ERCAN, F.; SIRVANCI, S.; YÜKSEL, M.; SENER, G.; ALICAN, I. **Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats.** *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 41, n. 8, p. 954-962, 2006.

JAIN, R.H. **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nat. Med.*, v. 9, n. 6, p. 685-693, 2003.

JAKOBISIAK, M. & GOLAB, J. **Potential antitumor effects of statins.** *Int. J. Oncol.*, v. 23, n. 4, p. 1055-1069, 2003.

JONES, M.K.; ITANI, R.M.; WANG, H.; TOMIKAWA, M.; SARFEH, I.J.; SZABO, S.; TARNAWSKI, A.S. **Activation of VEGF and Ras genes in gastric mucosa during angiogenic response to ethanol injury.** *Am. J. Physiol.*, v. 276, n. 6 Pt 1, p. G1345-1355, 1999.

JOZKOWICZ, A.; DULAK, J.; PRAGER, M.; NANOBASHVILI, J.; NIGISCH, A.; WINTER, B.; WIGEL, G.; HUK, I. **Prostaglandin-J2 induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR-gamma-independent manner.** *Prostagl. Other. Lipid. Mediat.*, v. 66, n. 3, p. 165-177, 2001.

KALINOWSKI, L.; DOBRUCKI, L.W.; BROVKOVYCH, V.; MALINSKI, T. **Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin.** *Circulation*, v. 105, n. 8, p. 933-938, 2002.

KIM, S.I.; HAN, D.C.; LEE, H.B. **Lovastatin inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells.** *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 11, n. 1, p. 80-87, 2000.

KOH, K.K. **Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis.** *Int J Cardiol.* v. 76, n. 1, p. 23-32, 2000

KREISELMEIER, N.E.; KRAYNACK, N.C.; COREY, D.A.; KELLEY, T.J. **Statin-mediated correction of STAT1 signaling and inducible nitric oxide synthase expression in cystic fibrosis epithelial cells.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, v. 285, n. 6, p. L1286-1295, 2003.

KRUMMEL, T. M.; NELSON, J. M.; DIEGELMANN, R. F.; **Fetal response to injury in the rabbit.** *J. Pediatr. Surg.*, v. 22, n. 7, p. 640-644, 1987.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Inflamação aguda e crônica.** In: *ROBBINS. Patologia básica.* 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2008, p. 33-62.

KURODA, M.; TSUJITA, Y.; TANZAWA, K.; ENDO, A. **Hypolipidemic effects in monkeys of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *Lipids*, v. 14, n. 6, p. 585-589, 1979.

KUREISHI, Y.; LUO, Z.; SHIOJIMA, I.; BIALIK, A.; FULTON, D.; LEFER, D.J.; SESSA, W.C.; WALSH, K. **The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals.** *Nat. Med.*, v. 6, n. 9, p. 1004-1010, 2000.

LAVAN, F. B. & HUNT, T. K. **Oxygen and wound healing.** *Clin. Plast. Surg.*, v. 17, n. 3, p. 463-472, 1990.

LANDSBERGER, M.; JANTZEN, F.; KONEMANN, S.; FELIX, S.B. **Blockade of geranylgeranylation by rosuvastatin upregulates eNOS expression in human venous endothelial cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 336, n. 4, p. 1005-1009, 2005.

LAUFS, U. & LIAO, J.K. **Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors.** *Trends Cardiovasc Med.* v. 10, n. 4, p. 143-148, 2000.

LAUFS, U.; LA FATA, V.; PLUTZKY, J.; LIAO, J.K. **Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors.** *Circulation*, v. 97, n. 12, p. 1129-1135, 1998.

LAUFS, U.; FATA, V.L.; LIAO, J.K. **Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase.** *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 50, p. 31725-31729, 1997.

LAZARUS, G. S.; COOPER, D. M.; KNIGHTON, D. R.; MARGOLIS, D.J.; PECORARO, R.E.; RODEHEAVER, G.; ROBSON, M.C. **Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing.** *Arch. Dermatol.*, v. 130, n. 4, p. 489-493, 1994.

LEY, K. **Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants.** *Immunol. Res.*, v. 24, n.1, p. 87-95, 2001.

LIAO, J.K. **Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins.** *J. Clin. Invest.*, v. 110, n. 3, p. 285-288, 2002.

LIAO, J.K. & LAUFS, U. **Pleiotropic effects of statins.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 89-118, 2005.

LIBBY, P. **Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease.** *Nutr. Rev.*, v. 65, n. 12 Pt 2, p. S140-S146, 2007.

LOUNEVA, N.; HUAMAN, G.; FERTALA, J.; JIMÉNEZ SA. **Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin.** *Arthritis Rheum.*, v. 54, n. 4, p. 1298-1308, 2006.

LUTTIKHUIZEN, D.T.; HARMSSEN, M.C.; LUYN, M.J.A.V. **Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction.** *Tissue Eng.*, v. 12, n. 7, p. 1955-1970, 2006.

LUTTUN, A.; TJWA, M.; CARMELIET, P. **Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 979, p. 80-93, 2002.

McFARLANE, S.I.; MUNIYAPPA, R.; FRANCISCO, R.; SOWERS, J.R. **Pleiotropic effects of Statins: lipid reduction and beyond.** *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, v. 87, n. 4, p. 1451-1458, 2002.

MADRI, J.A. & WILLIAMS, S.K. **Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components.** *J. Cell. Biol.*, v. 97, n. 1, p. 153-165, 1983.

MARTIN, J.; DENVER, R.; BAILEY, M.; KRUM, H. **In vitro inhibitory effects of atorvastatin on cardiac fibroblasts: implications for ventricular remodelling.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 32, n. 9, p. 697-701, 2005.

MARTÍNEZ-SALES, V.; VILA, V.; FERRANDO, M.; REGANON, E. **Atorvastatin neutralizes the up-regulation of thrombospondin-1 induced by thrombin in human umbilical vein endothelial cells.** *Endothelium*, v. 14, n. 4-5, p. 233-238, 2007.

MENDES, J.B.; CAMPOS, P.P.; FERREIRA, M.A.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. **Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice.** *J. Biom. Mat. Res. B. Appl. Biomater.*, v. 83, n. 2, p. 408-415, 2007.

MENDES, J.B.; CAMPOS, P.P.; ROCHA, M.A.; ANDRADE, S.P. **Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice.** *Life Sci.*, v. 84, n. 15-16, p. 537-543, 2009.

MENDOZA, M.G., ROBLES, H.V., ROMO, E., RIOS, A., ESCALANTE, B. **Nitric oxide-dependent neovascularization role in the lower extremity disease.** *Curr Pharm Des.*, v. 13, n. 35, p. 3591-3596, 2007.

MIGNATTI, P. & RIFKIN, D.B. **Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis.** *Enzyme & Protein.*, v. 49, n. 1-3, p. 117-137, 1996.

MIYAZONO, K.; USUKI, K.; HELDIN, C.H. **Platelet-derived endothelial cell growth factor.** *Prog. Growth Factor Res.*, v. 3, n. 3, p. 207-217, 1991.

MONTECUCCO, F. & MACH, F. **Update on statin-mediated anti-inflammatory activities in atherosclerosis.** *Semin. Immunopathol.*, v. 31, n. 1, p. 127-142, 2009.

MONTECUCCO, F.; BURGER, F.; PELLI, G.; POKU, N.K.; BERLIER, C.; STEFFENS, S.; MACH, F. **Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes.** *Rheumatology (Oxford)*, v. 48, n. 3, p. 233-242, 2009.

MOTAMED, K. & SAGE, EH. **Regulation of vascular morphogenesis by the matricellular protein SPARC.** *Kidney Int.*, v. 51, n. 5, p. 1383-1387, 1997.

MOSES, M.A. **The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors.** *Stem Cells (Dayton Ohio)*, v. 15, n. 3, p. 180-189, 1997.

MROWIETZ, U. & BOEHNCKE, W.H. **Leukocyte adhesion: a suitable target for anti-inflammatory drugs.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, n. 22, p. 2825-2831, 2006.

MUKAI, Y.; SHIMOKAWA, H.; MATOBA, T.; HIROKI, J.; KUNIHIRO, I.; FUJIKI, T.; TAKESHITA, A. **Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels.** *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 42, n. 1, p. 118-124, 2003.

MUNIYAPPA, R.; XU, R.; RAM, J.L.; SOWERS, J.R. **Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 278, n. 6, p. H1762-H1768, 2000.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; LEWIS, C.E. **Hipóxia regulates macrophage functions in inflammation.** *J. Immunol.*, v. 175, n. 10, p. 6257-6263, 2005.

MURPHY, G.; KNÄUPER, V.; COWELL, S.; HEMBRY, R.; STANTON, H.; BUTLER, G.; FREIJE, J.; PENDAS, A.M.; LÓPEZ-OTIN, C. **Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 878, p. 25-39, 1999.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. **Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

NALDINI, A. & CARRARO, F. **Role of inflammatory mediators in angiogenesis.** *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.*, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2005.

NARUMIYA, S.; ISHIZAKI, T.; WATANABE, N. **Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton.** *FEBS Lett.*, v. 410, n. 1, p. 68-72, 1997.

NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.

NÈGRE-AMINOU, P.; VAN VLIET, A.K.; VAN ERCK, M.; VAN THIEL, G.C.; VAN LEEUWEN, R.E.; COHEN, L.H. **Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1345, n. 3, p.259-268, 1997.

NICKENIG, G.; BAUMER, A.T.; TEMUR, Y.; KEBBEN, D.; JOCKENHOVEL, F.; BOHM, M. **Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men.** *Circulation*, v. 100, n. 21, p. 2131–2134, 1999.

NISHIKIMI, T.; TADOKORO, K.; WANG, X.; MORI, Y.; ASAKAWA, H.; AKIMOTO, K.; YOSHIHARA, F.; HORIO, T.; MINAMINO, N.; MATSUOKA, H. **Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, inhibits cardiac myocyte hypertrophy induced by endothelin.** *Eur. J. Pharmacol.*, v. 453, n. 2-3, p. 175-181, 2002.

NISSEN, N.N.; POLVERINI, P.J.; KOCH, A.E.; VOLIN, M.V.; GAMELLI, R.L.; DIPIETTO, L.A. **Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.** *Am. J. Pathol.*, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, 1998.

NIWA, S.; TOTSUKA, T.; HAYASHI, S. **Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line.** *Int. J. Immunoph.*, v. 18, n. 11, p. 669-675, 1996.

NÜBEL, T.; DIPPOLD, W.; KLEINERT, H.; KAINA, B.; FRITZ, G. **Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNFalpha and attenuates tumor cell adhesion.** *FASEB J.*, v. 18, n. 1, p. 140-142, 2004.

OHNISHI, T. & DAIKUHARA, Y. **Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues.** *Arch. Oral Biol.*, v. 48, n. 12, p. 797–704, 2003.

OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.R.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDINE, A.I. **Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms.** *Blood Cells Mol. Dis.*, v. 39, n. 2, p. 212-220, 2007.

PACKARD, C. **Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS).** *Circulation*, v. 97, n. 15, p. 1440-1445, 1998.

PAHAN, K.; SHEIKH, F.G.; NAMBOODIRI, A.M.S.; SINGH, I. **Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages.** *J. Clin. Invest.*, v. 100, n. 11, p. 2671-2679, 1997.

PEREIRA, F.E.L. **Inflamações**. In: FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia: 7ª Ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap 7, p 130-174.

PHILLIPS, C.L., PFEIFFER, B.J., LUGER, A.M., FRANKLIN, C.L. **Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim)**. *Kidney Int.*, v. 62, n. 2, p. 383-391, 2002.

PLUNKETT, M.L. & HAILEY, J.A. **An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate**. *Lab. Invest.*, v. 62, n. 4, p. 510-517, 1990.

PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. **Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis**. *Cytok.Growth Factor Rev.*, v. 16, n. 2, p. 159-178, 2005.

PRUEKSARITANONT, T.; QIU, Y.; MU, L.; MICHEL, K.; BRUNNER, J.; RICHARDS, K.M.; LIN, J.H. **Interconversion pharmacokinetics of simvastatin and its hydroxy acid in dogs: effects of gemfibrozil**. *Pharm. Res.*, v. 22, n. 7, p. 1101-1109, 2005.

PRUEKSARITANONT, T.; MA, B.; YU, N. **The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6**. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 56, n.1, p. 120-124, 2003.

QI, X.F.; KIM, D.H.; YOON, Y.S.; LI, J.H.; JIN, D.; TENG, Y.C.; KIM, S.K.; LEE, K.J. **Fluvastatin inhibits expression of the chemokine MDC/CCL22 induced by interferon-gamma in HaCaT cells, a human keratinocyte cell line**. *Br. J. Pharmacol.*, v.157, n. 8, p. 1441-1450, 2009.

RAHBAN, S.R. & GARNER, W. L. **Fibroproliferative scars**. *Clin. Plast. Surg.*, v. 30, n. 1, p. 77-89, 2003.

RAJOTTE, E.; ARAP, W.; HAGEDORN, M.; KOIVUNEN, E.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. **Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display**. *J. Clin. Invest.*, v. 102, n. 2, p. 430-437, 1998.

RAMOS, M.A.; KUZUYA, M.; ESAKI, T.; MIURA, S.; SATAKE, S.; ASAI, T.; KANDA, S.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A. **Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions**. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 18, n. 7, p. 1188-1196, 1998.



RAUCH, U.; OSENDE, J.I.; CHESEBRO, J.H.; FUSTER, V.; VORCHHEIMER, D.A.; HARRIS, K.; HARRIS, P.; SANDLER, D.A.; FALLON, J.T.; JAYARAMAN, S.; BADIMON, J.J. **Statins and cardiovascular diseases the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins.** *Atherosclerosis*, v. 153, n. 1, p. 181-189, 2000.

REGAN, M.C.; KIRK, S.J.; WASSERKRUG, H.L.; BARBUL, A. **The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype.** *J. Surg. Res.*, v. 50, n. 5, p. 442-448, 1991.

RIAD, A.; BIEN, S.; WESTERMANN, D.; BECHER, P.M.; LOYA, K.; LANDMESSER, U.; KROEMER, H.K.; SCHULTHEISS, H.P.; TSCHÖPE, C. **Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice.** *Cancer Res.*, v. 69, n. 2, p. 695-699, 2009.

RISSAU, W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature*, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. **Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta).** *Growth Factors*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 1993

ROBINSON, A.J.; KASHANIN, D.; O'DOWD, F.; FITZGERALD, K.; WILLIAMS, V.; WALSH, G.M. **Fluvastatin and lovastatin inhibit granulocyte macrophage-colony stimulating factor-stimulated human eosinophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1 under flow conditions.** *Clin. Exp. Allerg.*, 2009 (in press).

ROCHA, L.T., COSTA, K.A., OLIVEIRA, A.C., NASCIMENTO, E.B. Jr., BERTOLLO, C.M., ARAÚJO, F., TEIXEIRA, L.R., ANDRADE, S.P., BERALDO, H., COELHO, M.M. **Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone.** *Life Sci.*, v. 79, n. 5, p. 499-505, 2006.

ROMANO, M.; DIOMEDE, L.; SIRONI, M.; MASSIMILIANO, L.; SOTTOCORNO, M.; POLENTARUTTI, N.; GUGLIELMOTTI, A.; ALBANI, D.; BRUNO, A.; FRUSCELLA, P.; SALMONA, M.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. **Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins.** *Lab. Invest.*, v. 80, n. 7, p. 1095-1100, 2000.

ROMBOUTS, K.; KISANGA, E.; HELLEMANS, K.; WIELANT, A.; SCHUPPAN, D.; GEERTS, A. **Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells.** *J. Hepatol.*, v. 38, n. 5, p. 564-572, 2003.

RUPÉREZ, M.; RODRIGUES-DÍEZ, R.; BLANCO-COLIO, L.M.; SÁNCHEZ-LOPEZ, E.; RODRÍGUEZ-VITA, J.; ESTEBAN, V.; CARVAJAL, G.; PLAZA, J.J.; EGIDO, J.; RUIZ-ORTEGA, M. **HMG-CoA Reductase inhibitors decrease angiotensina II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways.** *Hypertension*, v. 50, n. 2, p. 377-383, 2007.

SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G.; BROWN, L.; WAMICA, J.W.; ARNOLD, J.M.; WUN, C.C.; DAVIS, B.R.; BRAUNWALD, E. **The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels.** *N. Engl. J. Med.*, v. 335, n. 14, p. 1001-1009, 1996.

SATA, M.; NISHIMATSU, H.; OSUGA, J.; TANTAKA, K.; ISHIZAKA, N.; ISHIBASHI, S.; HIRATA, Y.; NAGAI, R. **Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis.** *Hypertension*, v. 43, p. 1214-1220, 2004.

SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, J.; FRUCHART, J.C.; TAILLEUX, A.; FIEVET, C.; AUWERX, J. **3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase.** *FEBS Lett.*, v. 452, n. 3, p. 160-164, 1999.

SCHWARTZ, G.G.; OLSSON, A.G.; EZEKOWITZ, M.D.; GANZ, P.; OLIVER, M.F.; WATERS, D.; ZEIHNER, A.; CHAITMAN, B.R.; LESLIE, E.; STERN, T. **Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial.** *JAMA*, v. 285, n. 13, p. 1711-1718, 2001.

SHIRAKAWA, I.; SATA, M.; SAIURA, A.; KANEDA, Y.; YASHIRO, H.; HIRATA, Y.; MAKUUCHI, M.; NAGAI, R. **Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation.** *Biom. & Pharmacother.*, v. 61, n. 2-3, p. 154-159, 2007.

STAAL, A.; FRITH, J.C.; FRENCH, M.H.; **The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity.** *J. Bone Miner. Res.*, v. 18, n. 1, p. 88-96, 2003.

TAKEMOTO, M. & LIAO, J.K. **Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1712-1719, 2001.

TAN, A.; LEVREY, H.; DAHM, C.; POLUNOVSKY, V.A.; RUBINS, J.; BITTERMAN, P.B. **Lovastatin induces fibroblast apoptosis in vitro and in vivo. A possible therapy for fibroproliferative disorders.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 159, n. 1, p. 220-227, 1999.

TANG, L. & EATON, J.W. **Natural responses to unnatural materials: a molecular mechanism for foreign body reactions.** *Mol. Med.*, v. 5, n. 6, p. 351-358, 1999.

TANIMOTO, A.; MURATA, Y.; WANG, K.Y.; TSUTSUI, M.; KOHNO, K.; SASAGURI, Y. **Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells.** *J. Biol. Chem.*, v. 283, n. 8, p. 4643-4651, 2008.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.

TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R.A. **Angiogenesis in wound healing.** *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, v. 5, n. 1, p. 40- 46, 2000.

TRACEY, K.J. **The inflammatory reflex.** *Nature*, v. 420, n. 6927, p. 853-859, 2002.

TSIRPANLIS, G.; BOUFIDOU, F.; MANGANAS, S.; CHANTZIS, K.; BLETA, A.; STAMATELOU, K.; PSIMENOU, E.; NICOLAOU, C. **Treatment with fluvastatin rapidly modulates, via different pathways, and in dependence on the baseline level, inflammation in hemodialysis patients.** *Blood. Purif.*, v. 22, n. 6, p. 518-524, 2004.

TSUJITA, Y.; KURODA, M.; TANZAWA, K.; KITANO, N.; ENDO, A. **Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *Atherosclerosis*, v. 32, n. 3, p. 307-313, 1979.

URBICH, C.; DEMABACH, E.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. **Double-edged role of statins in angiogenesis signaling.** *Circ. Res.*, v. 90, n. 6, p. 737-744, 2002.

VAN HARMELEN, V.; SKURK, T.; RÖHRIG, K.; HAUNER, H. **HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin inhibits interleukin-6 expression and secretion in human adipocytes.** *Horm. Metab. Res.*, v. 35, n. 8, p. 466-470, 2003.

VAN ZUIJLEN, P.P.; ANGELES, A.P.; KREIS, R.W.; BOS, K.E.; MIDDDELKOOP, E. **Scar assessment tools: implications for current research.** *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 109, n. 3, p. 1108-1022, 2002.

VAUGHAN, C.J.; GOTTO JUNIOR, A.M.; BASSON, C.T. **The evolving role of statins in the management of atherosclerosis.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2000.

VEILLARD, N.R. & MACH, F. **Statins: The new aspirin.** *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 59, n. 11, p. 1771-1776, 2002.

VINCENT, L.; SORIA, C.; MIRSHAHI, F.; OPOLON, P.; MISHAL, Z.; VANNIER, J.P.; SORIA, J.; HONG, L. **Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, n. 4, p. 623-629, 2002.

VISSER, K.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. **Paradoxical roles of the immune system during cancer development.** *Nat. Rev. Cancer*, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.

XU, Z.M.; ZHAO, S.P.; LI, Q.Z.; NIE, S.; ZHOU, H.N. **Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome.** *Clin. Chim. Acta.*, v. 338, n. 1-2, p. 17-24, 2003.

WAGNER, A.H.; SCHWABE, O.; HECKER, M. **Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ.** *Br. J. Pharmacol.*, v. 136, n. 1, p. 143-149, 2002.

WANG, H.R.; LI, J.J.; HUANG, C.X.; JIANG, H. **Fluvastatin inhibits the expression of tumor necrosis factor-alpha and activation of nuclear factor-kappaB in human endothelial cells stimulated by C-reactive protein.** *Clin. Chim. Acta.*, v. 353, n. 1-2, p. 53-60, 2005.

WATANABE, Y.; ITO, T.; SAEKI, M.; KURODA, M.; TANZAWA, K.; MOCHIZUKI, M.; TSUJITA, Y.; ARAI, M. **Hypolipidemic effects of CS-500 (ML-236B) in WHHL-rabbit, a heritable animal model for hyperlipidemia.** *Atherosclerosis*, v. 38, n. 1-2, p. 27-31, 1981.

WATTS, K.L.; SAMPSON, E.M.; SCHULTZ, G.S.; SPITERI, M.A. **Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, v. 32, n. 4, p. 290-300, 2005.

WEIS, M.; HEESCHEN, C.; GLASSFORD, A.J.; COOKE, J.P. **Statins have biphasic effects on angiogenesis.** *Circulation*, v. 105, n. 6, p. 739-745, 2002.

WHEELER-JONES, C.; ABU-GHAZALEH, R.; COSPEDAL, R.; HOULISTON, R.A.; MARTIN, J.; ZACHARY, I. **Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase.** *FEBS Lett.*, v. 420, N. 1, p. 28-32, 1997.

WIERZBICKI, A.S.; MIKHAILIDIS, D.P.; WRAY, R.; SCHATER, M.; CRAMB, R.; SIMPSON, W.G.; BURNE, C.B. **Statin-fibrate combination: therapy for hyperlipidemia: a review.** *Curr. Med. Res. Opin.*, v. 19, n. 3, p. 155-168, 2003a.

WIERZBICKI, A.S.; POSTON, R.; FERRO, A. **The lipid and non-lipid effects of statins.** *Pharmacol. Ther.*, v. 99, n. 1, p. 95-112, 2003b.

WITTE, M.B. & BARBUL, A. **General principles of wound healing.** *Surg. Clin. North. Am.*, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

WONG, W.W.; DIMITROULAKOS, J.; MINDEN, M.D.; PENN, L.Z. **HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis.** *Leukemia*, v. 16, n. 4, p. 508-519, 2002.

WYNN, T. **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.** *J. Pathol.*, v. 214, n. 2, p. 199-210, 2008.

YAMADA, K.; SAKURAI, E.; ITAYA, M.; YAMASAKI, S.; OGURA, Y. **Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice.** *Invest. Ophthalm. Vis. Scien.*, v. 48, n. 4, p. 1839-1843, 2007.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W.; **Vascular-specific growth factor and blood vessel formation.** *Nature*, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.

YANG, J.; LI, X.P.; ZHAO, S.P.; LI, J.; LI, J.D.; XIE, X.M. **The effect of different doses of fluvastatin on inflammatory markers in the early phase of acute coronary syndrome.** *Clin. Chim. Acta.*, v. 368, n. 1-2, p. 183-187, 2006.

YILMAZ, B.; AKSAKAL, O.; GUNGOR, T.; SIRVAN, L.; SUT, N.; KELECKI, S.; SOYSAL, S.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. **Metformin and atorvastatin reduce**

**adhesion formation in a rat uterine horn model.** *Reprod. Biomed. Online*, v. 18, n. 3, p. 436-442, 2009.

ZICHE, M. & MORBIDELLI, L. **Nitric oxide and angiogenesis.** *J. Neurooncol.*, v. 50, n. 1-2, p.139-148, 2000.

ZINEH, I.; LUO, X.; WELDER, G.J.; DEBELLA, A.E.; WESSEL, T.R.; ARANT, C.B.; SCHOFIELD, R.S.; CHEGINI, N. **Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors.** *Pharmacotherapy*, v. 26, n. 3, p. 333-340, 2006.


ZHOU, M.S.; SCHUMAN, I.H.; JAIMES, E.A.; RAIJ, L. **Renoprotection by statins is linked to a decrease in renal stress oxidative, TGF- $\beta$ , and fibronectin with concomitant increase in nitric oxide bioavailability.** *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, v. 295, n. 1, p. F53-59, 2008.

# **ANEXOS**

## **ANEXO A**





Available online at  
  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
 www.em-consulte.com



Original article

# Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$ and TGF- $\beta$ 1

F.A. Araújo, M.A. Rocha, J.B. Mendes, S.P. Andrade\*

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais-UFMG, Avenida Antônio Carlos, 6627, Cep: 31.270-901 Belo Horizonte, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 February 2009

Accepted 24 March 2009

Available online 8 September 2009

### Keywords:

VEGF

TNF- $\alpha$

TGF- $\beta$

CCL2 (MCP1/JE) collagen

Implant

## ABSTRACT

While compelling evidence indicates beneficial effects of statins on inflammatory processes, besides their cholesterol-lowering activities, the actions on angiogenesis are less clear-cut. Our aim was to investigate the effects of atorvastatin on key components of inflammatory angiogenesis in the murine sponge model. Polyester-polyurethane sponges, used as a framework for fibrovascular tissue growth, were implanted in Swiss mice. Atorvastatin (0.6, 3 mg/kg/day) was given orally for 8 days in drinking water. The implants collected at day 9 postimplantation were processed for the assessment of hemoglobin, myeloperoxidase (MPO), N-acetylglucosaminidase (NAG) and collagen. Relevant inflammatory, angiogenic and fibrogenic cytokines were also determined. Atorvastatin treatment resulted in significant decrease in sponge vascularization (Hb content) and in VEGF levels at both doses. Neutrophil influx (MPO activity) was not affected by the compound whereas macrophage recruitment (NAG activity) was inhibited, suggesting a degree of selectivity by atorvastatin for this cell population. The level of CCL2 (MCP1-JE) was decreased only with 0.6 mg/kg. Atorvastatin was also able to reduce collagen deposition and the levels of transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1) intraplant, dose-dependently. The inhibitory function of atorvastatin on multiple parameters of main components of inflammatory angiogenesis revealed in this study is clearly associated with the modulatory effects of HMG-CoA reductase on VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 production.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

In a variety of pathological conditions such as rheumatoid arthritis, psoriasis, atherosclerosis, inflammation and angiogenesis are key processes acting simultaneously and synergistically for the maintenance the diseases. Analysis of both processes has revealed a number of molecules and cellular events as being essential for activation of leukocytes and formation of new blood vessels. These include vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor (TNF), transforming growth factor (TGF). Equally, a wide range of compounds with anti-angiogenic/anti-inflammatory activities has been described and many of these compounds have primary biological activities totally different from their original pharmacological purposes. A class of drugs used to lower blood cholesterol, the statins, exerts other effects in addition to their actions on serum lipid levels [1,2]. These compounds inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA) that suppresses the synthesis of mevalonic acid, a key intermediate in the cellular production of cholesterol. A number of studies have demonstrated that statins prevent atherosclerotic lesions, increase

expression of endothelial nitric oxide synthase, improve thrombotic events, reduce inflammation through decreased expression of cytokines, inhibit macrophage activities and endothelial and smooth muscle cells migration and proliferation [2–5]. Several *in vivo* studies are consistent with the notion that statins exert anti-angiogenic activities. For example, cerivastatin inhibited angiogenesis *in vivo* in matrigel and chick chorioallantoic membrane models [6] and simvastatin has been shown to inhibit VEGF-stimulated angiogenesis in the chorioallantoic membrane assay as well as FGF-stimulated angiogenesis in the corneal pocket assay [7]. Conversely, a number of studies *in vivo* have shown activation of angiogenesis by low-dose statins [8–10]. This effect has been attributed to the activation of PI3 kinase/Akt signalling pathway, which results in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation/Nitric oxide (NO) production [8,11,12]. It has been suggested that the above conflicting results are dose related, being that low doses of statins promote angiogenesis whereas high doses result in reduced angiogenesis [10,12,13].

Collectively, not only these reports expand the range of actions of atorvastatin that may explain several clinical improvements not associated with its cholesterol lowering action, but also pose intriguing contradictory actions of the compound on angiogenesis. In order to further characterize the actions of the statins on new

\* Corresponding author.

E-mail address: andrades@icb.ufmg.br (S.P. Andrade).

blood vessel formation, our aim in the present study was to assess the effects of atorvastatin in a murine sponge model of inflammatory angiogenesis. This model of angiogenesis has been extensively used to induce acute as well as chronic inflammatory responses allowing the characterization of key components of fibrovascular tissue (cell influx, blood vessels formation, extracellular matrix deposition). The effects of various anti-inflammatory/anti-angiogenic compounds have also been determined using the implantation technique [14,15]. We monitored local inflammatory changes, angiogenesis index and fibrogenic response using markers for these activities in groups of animals treated with atorvastatin. Such measurements should allow for the identification of the processes and mechanisms underlying the actions of atorvastatin in modulating key components of the newly formed proliferating tissue and for characterization of the therapeutic potential of controlling inflammatory angiogenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Swiss mice 7–8 weeks (30–35 g body weight) used in these experiments were provided by the Central Animal Facility at the Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais-Brazil. The animals were housed individually and provided with chow pellets and water *ad libitum*. The light/dark cycle was 12:12 h with lights on at 7:00 a.m. and lights off at 7:00 pm. Efforts were made to avoid all unnecessary distress to the animals. Housing, anaesthesia and postoperative care concurred with the guidelines established by our local Institutional Animal Welfare Committee.

### 2.2. Preparation of sponge discs, implantation and treatment

Polyether-polyurethane sponge (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) was used as the implanted material. The implants were discs, 5 mm thick  $\times$  8 mm diameter and were soaked overnight in 70% v/v ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 15 minutes before implantation. For that, the animals were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p. Aldrich, USA), the dorsal hair shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch, which had been made with curved artery forceps through a 1 cm long dorsal mid-line incision. Postoperatively, the animals were monitored for any signs of infection at the operative site, discomfort or distress; any showing such signs were immediately humanely killed. Atorvastatin (Pfizer/Brazil) was given orally in drinking water to provide 0.6 and 3 mg/kg/day. The treatment started on the day of the implantation and lasted for 9 days. The control group of mice received vehicle (tap water) according to the same schedule. The doses of the compound and the treatment regimen and doses were chosen based on pilot experiments and on the range used in experiments reported in the literature that exerted positive or negative effects on angiogenesis in different animal models [8–10]. The treatment and sponge implants were well tolerated by the mice over the experimental period.

### 2.3. Hemoglobin extraction

The extent of the vascularization of the sponge implants was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin's method [15,16]. Nine days postimplantation, the animals were euthanized and the sponge implants carefully removed, dissected from adherent tissue, weighed. Each implant was homogenized (Tekmar TR-10, OH) in 2 ml of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil), and centrifuged at 12,000  $\times$  g for

20 min. The supernatants were filtered through a 0.22- $\mu$ m millipore filter. The hemoglobin concentration of the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an Elisa plate reader and was compared against a standard curve of hemoglobin. The content of hemoglobin in the implant was expressed as  $\mu$ g Hb per mg wet tissue.

### 2.4. Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and *N*-acetylglucosaminidase activities

The extent of neutrophil accumulation in the implants was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described [15,16]. After processing the supernatant of the implants for the hemoglobin determination (see above), a part of the corresponding pellet was weighed, homogenized in (2 ml) pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015 M Na-EDTA) and centrifuged at 12,000  $\times$  g for 10 min. The pellets were then resuspended in 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM). The reaction was terminated by the addition of 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 M). Results were expressed as change in OD per gram of wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells into the implants was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme *N*-acetylglucosaminidase (NAG) which is present in high levels in activated macrophages [15,16]. Part of the pellet that remained after the hemoglobin measurement was kept for this assay. These pellets were weighed, homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega), and centrifuged (3,000  $\times$  g; 10 min at 4 °C). Samples of the resulting supernatant (100  $\mu$ l) were incubated for 10 min with 100  $\mu$ l of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 4.5) to yield a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by the addition of 100  $\mu$ l of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. The readings were interpolated on a standard curve constructed with *p*-nitrophenol (0–500 nmol ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich). Data are reported as nanomole of products formed per milligram of wet tissue (implant).

### 2.5. Measurement of VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and MCP-1 production in the sponge implants

For this procedure, the implants were removed at day 9 postimplantation, homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween 20 and centrifuged at 10,000  $\times$  g for 30 min. The cytokines VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and MCP-1 in the supernatant from each implant were measured in 50  $\mu$ l of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates that were coated with a specific murine monoclonal antibody against the cytokine. This was followed by the addition of a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50  $\mu$ l of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10 mg/ml in DMSO) was added to the wells. Color development was stopped, after 20 min of incubation, with 2N sulphuric acid (50  $\mu$ l) and the intensity of the color was measured at 540 nm on a spectrophotometer ( $E_{\max}$  – molecular devices). Standards were 0.5-log<sub>10</sub> dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 pg ml<sup>-1</sup> to 1000 pg ml<sup>-1</sup> (100  $\mu$ l). The results were expressed as pico cytokine per milligram wet tissue.

## 2.6. Collagen measurement

Total soluble collagen was measured in whole tissue homogenates by the Sirius Red reagent based-assay [16,17]. The implants were homogenized in 1 ml of PBS and 50  $\mu$ l of sample were mixed with 50  $\mu$ l of Sirius Red reagent. Samples were mixed by gentle inversion. The collagen-dye complex was precipitated by centrifugation at 5000  $\times$  g for 10 min. The supernatants were drained off and discarded and the pellet washed with 500  $\mu$ l of ethanol (99% pure and methanol free). One millilitre of a 0.5 M NaOH solution was added to the remaining pellet of collagen-bound dye. After solubilization, samples were transferred to a 96-well plate and read at 540 nm. The calibration curve was set up on the basis of a gelatin standard (Merck, USA). The results are expressed as microgram collagen per milligram wet tissue.

## 2.7. Histological analysis and staining

The sponge implants from a separate group of mice were excised carefully, dissected from of adherent tissue and fixed in formalin (10% w/v in isotonic saline). Sections (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and processed for light-microscopic studies.

## 2.8. Statistical Analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons were carried out using one-way analysis of variance (Anova) followed by Newman-Keuls correction factor for multiple comparisons as a post-test (number of samples were stated in the figure legends; usually 8 to 10 animals). Differences between means were considered significant when *P* value was < 0.05.

## 3. Results

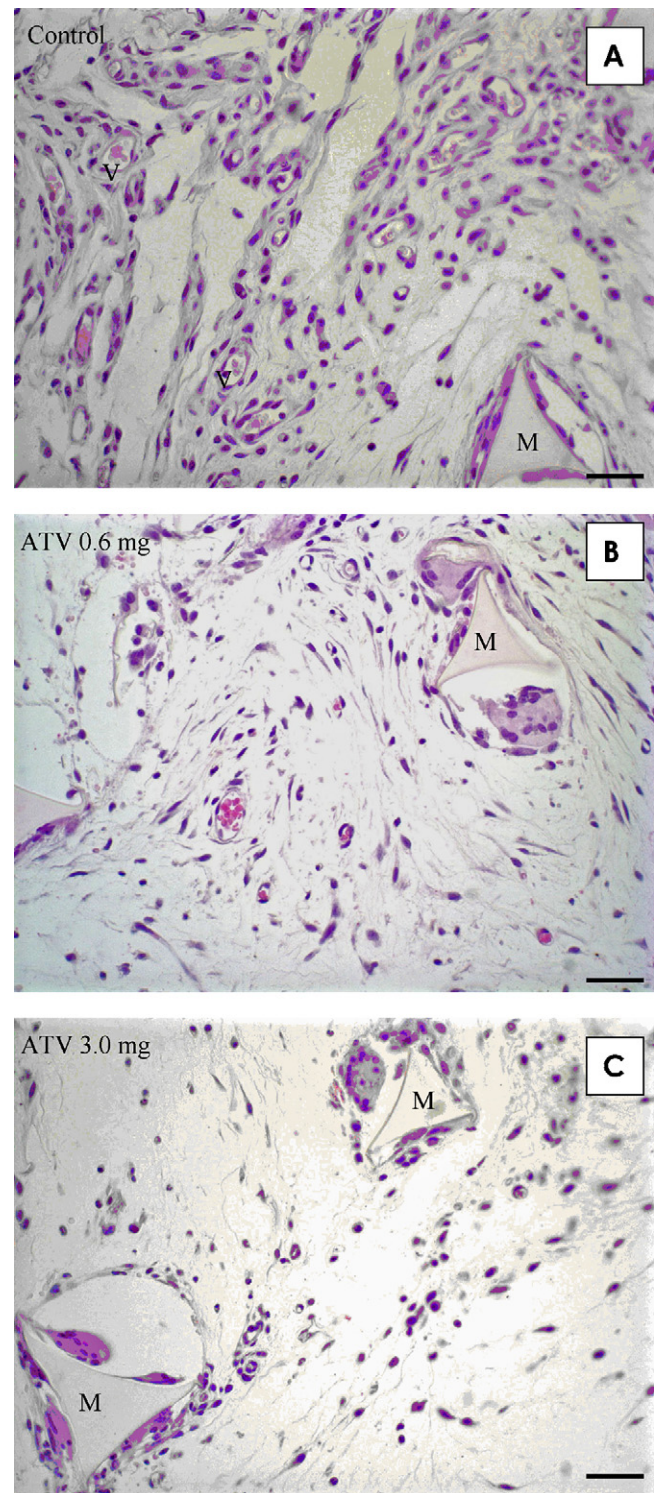
Systemic administration of the atorvastatin (0.6 and 3 mg/kg) during 8 days showed no signs of toxicity such as weight loss, sedation, or alterations in motor activity of the animals. The surgical procedure, the sponge matrix and, the treatment were well tolerated by all animals. Atorvastatin at both doses (0.6 and 3 mg/kg) for the period of 8 days caused no significant reduction in serum levels of total cholesterol (vehicle, 127  $\pm$  5 vs atorvastatin 0.6 mg, 126  $\pm$  18 vs atorvastatin 3 mg, 143  $\pm$  12 mg/dl), triglyceride (42.4  $\pm$  8 vs 52  $\pm$  9 vs 38  $\pm$  7), HDL (23  $\pm$  2 vs 21  $\pm$  2 vs 23  $\pm$  1) and LDL (36  $\pm$  10 vs 39  $\pm$  6 vs 35  $\pm$  5).

### 3.1. Histological assessments

No signs of infection or rejection were observed in the implant compartment during the 9-day period of the experiment. Subcutaneous implantation of sponge discs in mice induced an inflammatory angiogenesis response causing the synthetic matrix to be filled with fibrovascular stroma. This tissue was vascularized containing inflammatory cells, multinucleated giant cells, spindle-shaped fibroblast-like cells interspersed with the implant matrix. The systemic treatment with atorvastatin (0.6 and 3 mg/kg) clearly inhibited the fibrovascular tissue and the cellular components in the implants (Fig. 1A–C).

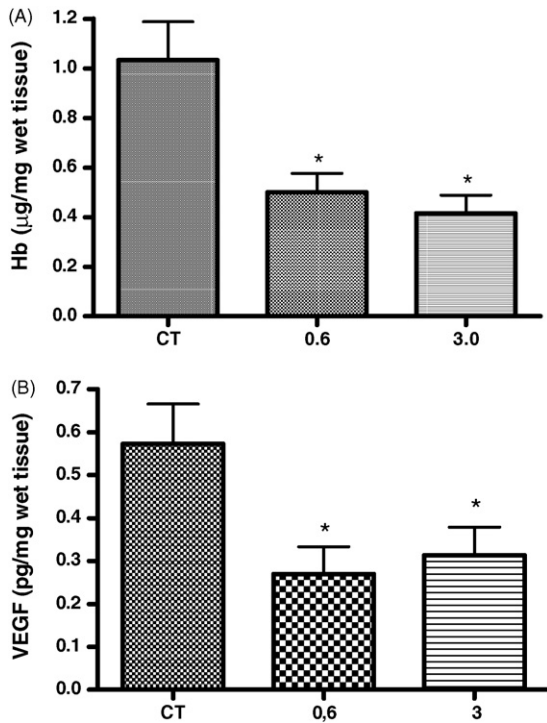
### 3.2. Measurement of anti-angiogenic effects

Daily oral doses of atorvastatin (0.6 and 3 mg/kg) given to different groups of mice during 8 days reduced neovascularisation of the implants, as detected by changes in the hemoglobin content and in the levels of VEGF of the implants (a marker for



**Fig. 1.** Representative histological sections (5  $\mu$ m, stained with H & E) of sponge implants. The pores of the sponge matrix are filled with inflammatory cells, spindle-shaped fibroblasts, blood vessels. In (A), the control fibrovascular tissue is denser and more vascularized compared with the atorvastatin-treated groups at the doses of 0.6 mg/kg (B) and 3 mg/kg (C). M: matrix; V: blood vessels; Bar: 100  $\mu$ m.

angiogenesis) (Fig. 2A). In implants of vehicle-treated animals the hemoglobin levels were 0.7  $\pm$  0.06  $\mu$ g Hb/mg wet tissue (*n* = 11); versus 0.5  $\pm$  0.07 (0.6 mg/kg; *n* = 10) versus 0.42  $\pm$  0.07 (3 mg/kg; *n* = 10). VEGF assayed in the implants showed that atorvastatin treatment decreased the levels of this molecule in the treated implants (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Effects of atorvastatin on angiogenesis in sponge implants. In (A) the hemoglobin content of the tissue decreased after the systemic treatment with both doses of atorvastatin (0.6 or 3 mg/kg). The levels of VEGF were reduced by the treatment (B). Values shown are the means ( $\pm$  SEM) from groups of 8–10 animals. \* $p < 0.05$  versus control group.

### 3.2.1. Measurement of leukocyte accumulation and the pro-inflammatory cytokines

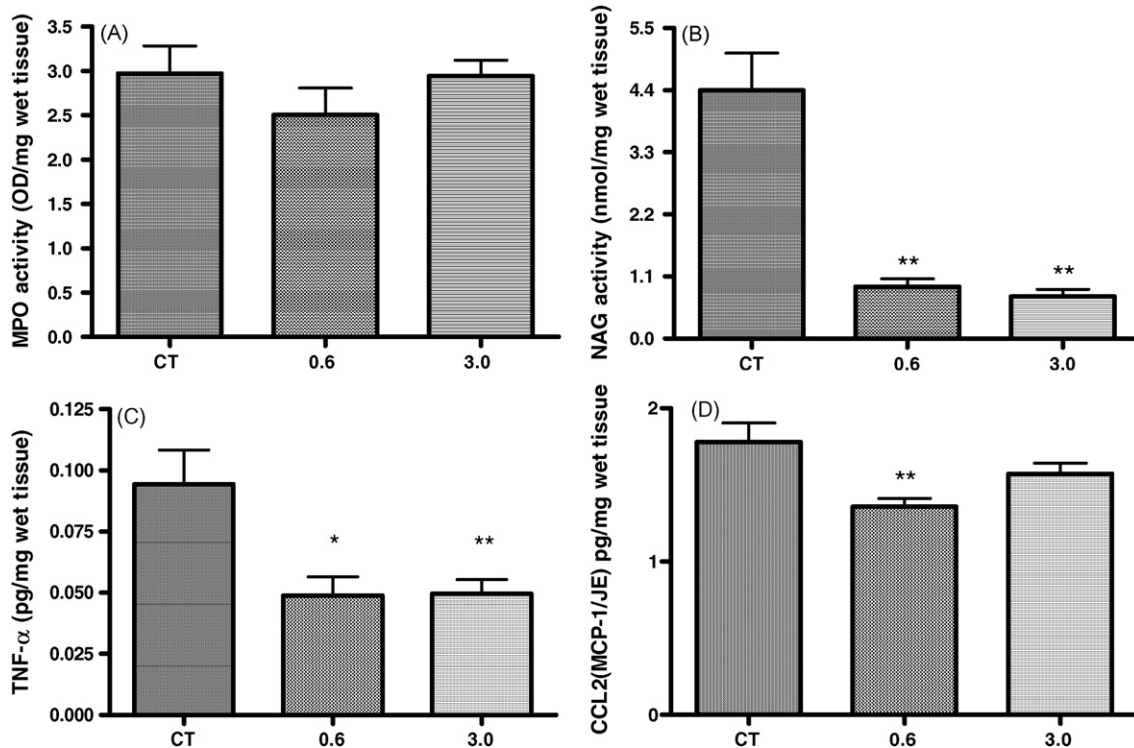
The inflammatory components of the sponge-induced inflammation were determined by estimating the numbers of the leukocytes in the implant by assaying inflammatory enzyme activities and levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and CCL2 [MCP-1/JE]). Neutrophil numbers (as MPO activity) was not affected by atorvastatin treatment (Fig. 3A). However, the compound at both doses (0.6 and 3 mg/kg) was able to decrease NAG activity (macrophages number), TNF- $\alpha$  and CCL2 (MCP-1/JE) levels in the implants (Fig. 3B, C and D).

### 3.3. Measurement of TGF- $\beta$ 1 and collagen deposition

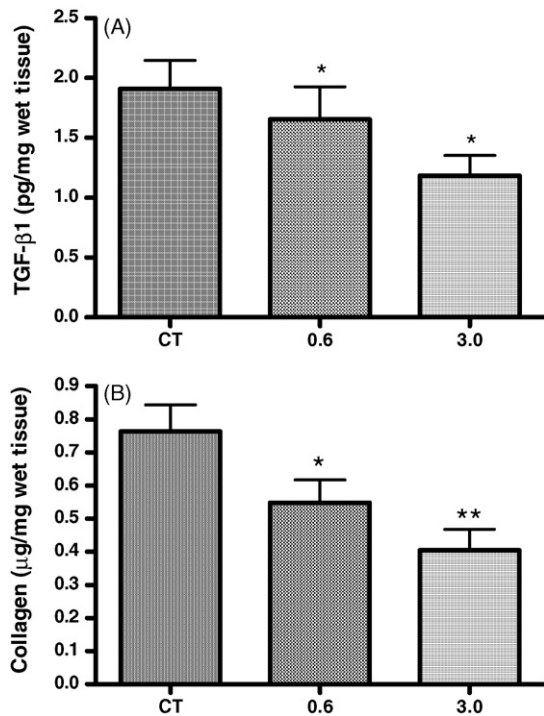
As shown in Fig. 4A and B, in the supernatant of the implants there was a clear decrease in the cytokine levels and in collagen deposition intraimplant by atorvastatin treatment.

## 4. Discussion

We utilized an in vivo model of inflammatory angiogenesis to evaluate the activity of atorvastatin because this compound has been shown to possess other actions beyond its effects on lowering cholesterol including antiproliferative, anti-inflammatory and biphasic effects on angiogenesis depending on dosages, treatment regimens, and experimental models [18,19,13]. It seemed therefore, relevant to assess atorvastatin in another animal model to further advance our understanding on the angiogenic actions of the compound. In this study, we used a murine model of inflammatory angiogenesis to investigate the effects of atorvastatin on key components (angiogenesis, inflammation and fibrosis) of the fibrovascular tissue induced by synthetic implants. In this model,



**Fig. 3.** Effects of atorvastatin (0.6 and 3 mg/kg/day) on inflammatory parameters; neutrophil accumulation (A) macrophage accumulation (B), TNF- $\alpha$  levels (C) and CCL2/MCP-1/JE (D) in sponge implants. Except for neutrophil number (MPO activity) significant decreases were attained by the treatment for NAG activity, TNF- $\alpha$  and CCL2/MCP-1/JE levels. Values shown are the means ( $\pm$  SEM) from groups of 8–10 animals in each group. \* $p < 0.05$  versus control group.



**Fig. 4.** Effects of atorvastatin on TGF-β1 (A) level and collagen deposition (B) in sponge implant. An overall decrease in the fibrogenic parameters was observed after systemic treatment with both doses of atorvastatin. Values shown are the means ( $\pm$ SEM) from groups of 8–10 animals. \* $p < 0.05$  versus control group.

inflammatory cell recruitment, angiogenesis and extracellular matrix deposition have been shown to be modulated by a number of potential therapeutic compounds [14,15]. By assessing atorvastatin in the sponge model, we were able to identify its effects on critical early steps of the formation of the fibrovascular tissue. Our studies demonstrate an inhibitory activity of atorvastatin on the inflammatory, angiogenic and fibrogenic components of the newly formed tissue at both low and high doses (0.6 or 3 mg/kg). In addition, our study revealed the effect of atorvastatin on inhibiting pro-inflammatory, pro-angiogenic and profibrogenic cytokines within the sponge implants. Our first set of results showed that the treatment successfully inhibited fibrovascular tissue infiltration depicted in the histological analysis. A more marked effect of atorvastatin was in decreasing angiogenesis which was assessed by hemoglobin content and by VEGF levels. Our results are in line with previously published work that showed that cerivastatin (another statin) inhibited angiogenesis in other *in vivo* model [6,7]. However, they are in contrast with the study by Weis et al. [10] in which high doses of statins (cerivastatin and atorvastatin) reduced tumor and inflammation-induced vascularization whereas low doses enhanced angiogenesis. At least, in part, this discrepancy may be attributed to a number of different factors, such as animal models and species, via of administration, dosage and, duration of treatments and experiments.

VEGF levels in the implant after treatment with the two doses of atorvastatin were also reduced corroborating the anti-angiogenic effect of the compound, since in many models this cytokine has been shown to be an essential mediator of neovascularization, inducing dose-related growth of new blood vessels [20]. In addition, the importance of this cytokine in inflammation-mediated angiogenesis has been shown by the treatment with neutralizing antibody to rhVEGF in a murine chronic granulomatous tissue air pouch model [21]. More recently, atorvastatin treatment has been shown to inhibit laser-induced choroidal neovascularization by VEGF downregulation [22]. *In vitro*, the

anti-angiogenic effects of high doses of atorvastatin were associated with decreased endothelial release of VEGF [10].

The inflammatory components of the implants were assessed by histology, pro-inflammatory enzymes and cytokines. Histological examination showed a clearly decreased cellularity in the atorvastatin-treated groups. In these groups MPO activity (representing activated neutrophils) was not affected by the treatment, showing a lack of effect of the compound on this inflammatory cell population. However, NAG activity (representing activated macrophages/monocytes) was significantly decreased in the treated groups suggesting a degree of selectivity by atorvastatin. As expected the levels of TNF- $\alpha$  and CCL2 (MCP-1/JE) were decreased in the implants of atorvastatin-treated groups. Other recent studies have reported the anti-inflammatory effect of statins. Particularly, relevant in this context is the fact that rosuvastatin (other statin) has been shown to decrease macrophage infiltration into the atherosclerotic lesions as determined by anti-MOMA-2 immunostaining [23]. In addition, the fact that HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte recruitment *in vivo* [24] and the production of MCP-1/JE in the mouse air pouch model of local inflammation [25] provides further confirmatory evidence for the anti-inflammatory effect of statins.

The decreased collagen deposition in the treated groups and the lower level of the pro-fibrogenic cytokine TGF-β1 were further signs of low inflammation observed in our model. In accordance with our findings, it has been reported that atorvastatin reduced infiltration of inflammatory cells, expression of TGF-beta in a murine model of cardiac transplantation [26] and that oral pravastatin treatment decreased collagen deposition in infarcted myocardium [27].

The effects of atorvastatin on the multiple parameters of main components of inflammatory angiogenesis were independent of cholesterol lowering activity, since no significant changes in serum levels of total cholesterol, low and high-density lipoprotein cholesterol and triglyceride were detected. Because statins inhibit the synthesis of important molecules involved in posttranslational prenylation of Ras, Rho, Rac, which modulate cellular signaling, differentiation and proliferation [28], it may be possible that the inhibitory effect of atorvastatin observed in our angiogenesis model may have occurred through similar mechanisms.

Altogether, our results confirm and extend previous findings of the anti-inflammatory/antiangiogenic actions of atorvastatin but have failed to show a biphasic/dual action of the compound on these processes. Our data suggest that these inhibitory functions of atorvastatin are associated with down regulation of angiogenic, inflammatory and fibrogenic cytokines in the sponge implant model.

#### Acknowledgements

This work was supported by CNPq, Brazil.

#### References

- [1] Shepherd J, Packard CJ. Pharmacological approaches to the modulation of plasma cholesterol. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:326–9.
- [2] Halcox JP, Deanfield JE. Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation* 2004;109:1142–8.
- [3] Bobik A, Campbell JH. Vascular derived growth factors: cell biology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993;45:1–42.
- [4] Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, Mirshahi-Khorassani T, et al. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett* 2001;495:159–66.
- [5] Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Yazawa K, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor (pravastatin) inhibits endothelial cell proliferation dependent on G1 cell cycle arrest. *Anticancer Drugs* 2004;625–32.

- [6] Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:623–9.
- [7] Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res* 2002;91:143–50.
- [8] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004–10.
- [9] Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J* 2001;15:2530–2.
- [10] Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739–45.
- [11] Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp 90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Cir Res* 2001;89:866–73.
- [12] Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edge role of statins in angiogenesis signaling. *Cir Res* 2002;90:737–44.
- [13] Li M, Losordo DW. Statins and the endothelium. *Vasc Pharmacol* 2007;46:1–9.
- [14] Belo AV, Leles F, Barcelos LS, Ferreira MAND, Bakhle YS, Teixeira MM, et al. Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation* 2005;12:597–606.
- [15] Ferreira MA, Barcelos LS, Teixeira MM, Bakhle YS, Andrade SP. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci* 2007;81:210–7.
- [16] Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004;114:438–46.
- [17] Campos PP, Bakhle YS, Andrade SP. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Rep Reg* 2008;16:416–24.
- [18] Wolfran S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1–8.
- [19] Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712–9.
- [20] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;21:4368–80.
- [21] Appleton I, Brown NJ, Willis D, Coville-Nash PR, Alam C, Brown JR, et al. The role of vascular endothelial growth factor in a murine chronic granulomatous tissue air pouch model of angiogenesis. *J Pathol* 1996;180:90–4.
- [22] Yamada K, Sakurai E, Itaya M, Yamasaki S, Ogura Y. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1839–43.
- [23] Enomoto S, Sata M, Fukuda D, Nakamura K, Nagai R. Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice. *Biomed Pharmacother* 2009;63:19–26.
- [24] Han KH, Ryu J, Hong KH, Ko J, Pak YK, Kim JB, et al. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo. *Circulation* 2005;111:1439–47.
- [25] Romano M, Diomedea L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, et al. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095–100.
- [26] Shirakawa I, Sata M, Saiura A, Kaneda Y, Yashiro H, Hirata Y, et al. Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation. *Biomed Pharmacother* 2007;61:154–9.
- [27] Li TS, Takahashi M, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Mikamo A, Hamano K. Pravastatin improves remodeling and cardiac function after myocardial infarction by an anti-inflammatory mechanism rather than by induction of angiogenesis. *Ann Thorac Surg* 2006;81:2217–26.
- [28] Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28:627–36.

## **ANEXO B**

- Anuros em ambientes desérticos: lições da caatinga brasileira.  
*José Eduardo de Carvalho (UNIFESP)*
- Adaptações fisiológicas ao exercício físico em beija-flores.  
*José Eduardo Pereira Wilken Bicudo (IB-USP)*

## Sala 7

### Tópicos em Aterosclerose.

Coordenador: *Raul Cavalcante Maranhão (INCor-HCFMUSP)*

MC: Estado atual da participação dos processos oxidativos na aterogênese.

*Dulcineia Saes Parra Abdalla (FCF-USP)*

MC: Coagulação e Aterosclerose.

*Sérgio Paulo Bydlowski (FMUSP)*

MC: Inflamação e Aterosclerose.

*Carlos Vicente Serrano Junior (INCor-HCFMUSP)*

CO: 12.038 – Atorvastatina inibe a angiogênese inflamatória em camundongos através da modulação de VEGF, TNF- e TGF- 1.

*Araújo F.A., Rocha M.A., Mendes J.B., Andrade S.P. Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG, Enfermagem-Faculdade da Saúde e Ecologia Humana, MG, Centro Universitário de Sete Lagoas, UNIFEMM*

CO: 11.055 - Os efeitos do treinamento resistido no metabolismo da lipoproteína de baixa densidade.

*Silva J.L., Vinagre C.G., Morikawa A.T., Alves M.J.N. Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP*

## Sala 8

### Nanotecnologia e Técnicas Nucleares em Saúde.

Coordenador: *Valbert Nascimento Cardoso (UFMG)*

MC: Nanoestruturas radiomarcadas para identificação de focos inflamatórios e infecciosos.

*Valbert Nascimento Cardoso (UFMG)*

MC: Antibiótico radiomarcado na diferenciação de processos inflamatórios e infecciosos em modelo experimental.

*Simone Odília Fernandes Diniz (UFMG)*

MC: Lipossomas pH sensíveis em Oncologia.

*Elaine Amaral Leite (UFMG)*

CO: 34.029 - Nanoparticles used for localization of tumorigenic markers.

*Pavon L.F., Gamarra L.F., Oliveira D.M., Marti L.C., Guillen D.D., Sibov T.T., Amaro Júnior, E. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE*

CO: 08.013 Influence of ionizing radiation on human lymphocytes survival.

*Feliciano de Souza T., Amaral A., Cavalcanti, M.B., Freitas-Silva R., Lima S.C., Fernandes T.S. Departamento de Energia Nuclear, UFPE*

## Sala 9

### Centros de referência nacional de criação de modelos animais para pesquisa e imunobiológicos.

Coordenador: *Valderez Bastos Valero Lapchik (UNIFESP)*

- Criação de animais de laboratório no biotério do CEDEME-UNIFESP.  
*Gui Mi Ko (UNIFESP)*

• Criação de animais de laboratório no biotério do CEMIB-UNICAMP.

*Delma Pegolo Alves (UNICAMP)*

• Criação de animais de laboratório no biotério Central do Instituto Butantan.

*Vania Moura (Instituto Butantan)*

• Criação de animais de laboratório no biotério do CECAL-FIOCRUZ.

*Sebastião Enes Reis Couto (FIOCRUZ)*

## Sala 10

### Rim e hipertensão arterial.

Coordenador: *Guiomar Nascimento Gomes (UNIFESP)*

MC: Alterações morfológicas renais na hipertensão arterial experimental.

*Guiomar Nascimento Gomes (UNIFESP)*

MC: Papel do sistema nervoso simpático na hipertensão renovascular.

*Cássia de Toledo Bergamaschi (UNIFESP)*

MC: Disfunção Renal na Hipertensão Arterial: um marcador do risco cardiovascular.

*Osvaldo Kolmann Jr. (UNIFESP)*

CO: 13.026 - Nefrogênese *in vitro*: a hipertensão pode ser programada desde o desenvolvimento?

*Mesquita F.F., Gontijo J.A.R., Bertram J.F., Armitage J., Boer P.A. Departamento Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Department of Developmental Biology, Monash University, Austrália, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu*

CO: 12.013 - Overexpression of *cuznsod* into the rostral ventrolateral medulla (RVLM) prevents goldblatt hypertension.

*Oliveira E.B., Colombari D.S.A., Davisson R.L., Murphy D., Campos R.R., Paton J.F.R.; Department of Physiology and Pharmacology, Bristol Heart Institute, Bristol University, UK, Department of Physiology, UNIFESP, Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, USA, Department of Physiology, Faculdade de Odontologia, UNESP-Araraquara, Henry Wellcome Laboratories for Integrated Neuroscience, Bristol University, Bristol, UK*

## Sala 11

### Central opioid and non-opioid mechanisms of pain modulation.

Coordenador: *Ricardo Luiz Nunes de Souza (UNESP-Araraquara)*

MC: Contribution of the Periaqueductal Gray to Morphine tolerance.

*Mike Morgan (Washington State University, Canada)*

MC: Fear-induced antinociception: influence of opioid and non-opioid mechanisms.

*Ricardo Luiz Nunes de Souza (UNESP-Araraquara)*

MC: Descending circuitry for nociception facilitation.

*Carlos Rogério Tonussi (UFSC)*

CO: 03.224 - GLYA receptor blockade in the rat dorsal periaqueductal gray produced anxiety and opposite effects on nociception.

*Martins M.A., Dassoler F., Melo N.E.B., Tonussi C.R. Department of Pharmacology, CCB, UFSC*



**03.158**

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO COM-  
PORTAMENTAL CRUZADA ENTRE ES-  
TRESSE E ETANOL EM CAMUNDONGOS  
ADOLESCENTES E ADULTOS

Rocha, J. B. S., Teixeira, A. M. A., Cama-  
rini, R.

Dept Farmacologia/ICB, USP Av Prof Lineu  
Prestes, 1524

**03.159**

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO FLUORETO  
DE SÓDIO NO DESEMPENHO MOTOR DE  
CAMUNDONGOS

Graça, A. C. C.<sup>1</sup>, Medeiros, A. H.<sup>1</sup>, Abreu-  
Villça, Y.<sup>1</sup>, Manhães, A. C.<sup>1</sup>, Filgueiras, C.  
C.<sup>1</sup>, Meyer, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Neurofisiologia - DCF/  
UERJ, DCF/UERJ Av Prof Manuel de Abreu  
444, 5º and, sl 10, Vila Isabel, RJ, CEP:  
20550170 <sup>2</sup> Instituto de Estudos em  
Saúde Coletiva (IESC)/UFRJ, IESC/UFRJ Rio  
de Janeiro

**03.160**

MELHORA DOS SINTOMAS NEGATIVOS  
E POSITIVOS NA ESQUIZOFRENIA: UM  
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, DU-  
PLO-CEGO, CONTROLADO COM PLACE-  
BO COM MEMANTINA COMO TERAPIA  
ADJUVANTE À CLOZAPINA

Lersch, C.<sup>1,2</sup>, Martinelli, B.Z.<sup>1,2</sup>, Lucena,  
D.<sup>1,3,4</sup>, Fernandes, B.<sup>3,4,5</sup>, Medeiros, D.W.<sup>4</sup>,  
Pedrini, M.<sup>4</sup>, Kunz, M.<sup>1,3,4</sup>, Lobato, M.I.R.<sup>3,4</sup>,  
Belmonte-de-Abreu, P.<sup>1,3,4</sup>, Gama, C.S.<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Psiquiatria Molecular,  
HCPA - UFRGS Rua Ramiro Barcelos, 2350 <sup>2</sup>  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre, UFCSPA Rua Sarmento  
Leite, 245 <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Psiquiatria, UFRGS Rua  
Ramiro Barcelos, 2400 <sup>4</sup> Programa de  
Esquizofrenia, HCPA Rua Ramiro Barcelos,  
2350 <sup>5</sup> Programa de Transtorno de Humor  
Bipolar, HCPA Rua Ramiro Barcelos, 2350  
<sup>6</sup> University of Melbourne, Univer. of Mel-  
bourne Austrália <sup>7</sup> Orygen Research Centre,  
Orygen Research Austrália <sup>8</sup> Mental Health  
Research Institute, Mental Health Inst.  
Austrália <sup>9</sup> INCT Translacional em Medicina,  
INCT Rua Ramiro Barcelos, 2350

**03.161**

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ALOJA-  
MENTO NO COMPORTAMENTO DEFENSI-  
VO E NA NEUROGÊNESE DO HIPOCAMPO  
DE CAMUNDONGOS

Felislino, CS<sup>1</sup>, Duarte, FS<sup>1</sup>, Marino Neto,  
J<sup>2,3</sup>, Lino-de-Oliveira, C<sup>2</sup>, de Lima, TCM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Farmacologia, FMC-UFSC UFSC-Campus  
Universitário Trindade <sup>2</sup> Ciências Fisiológi-  
cas, CFS-CCB-UFSC UFSC-Campus Univer-  
sitário Trindade <sup>3</sup> Instituto de Engenharia  
Biomédica, IEB-CTC-UFSC UFSC-Campus  
Universitário Trindade

**03.162**

MUSCARINE RECEPTORS IN LATERAL SEP-  
TAL AREA MODULATES THE CARDIOVAS-  
CULAR RESPONSE TO RESTRAIN STRESS.

Reis D.G., Tavares R.F., Scopinho A.A.,  
Corrêa F.M.A.

Depto.Farmacologia/Faculdade de Me-  
dicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP Av.  
Bandeirantes, 3900

**03.163**

THE ROLE OF THE DENTATE GYRUS IN

THE ACQUISITION OF AN EPISODIC-LIKE  
MEMORY TASK.

Barbosa, F. F., Pontes, I. M. O., Ribeiro, A.  
M., Silva, R. H.

Departamento de Fisiologia, UFRN Campus  
Central, Lagoa Nova, Natal/RN

**03.164**

THE ROLE OF THE MUSCARINIC M1 RE-  
CEPTOR IN A SHORT-TERM MEMORY FOR  
CONTEXT-SHOCK ASSOCIATION.

Mazzeo, R. T., Soares, J. C. K., Soeiro,  
A.C., Antonio, B. B., Fornari, R.V., Oliveira,  
M.G.M

Depto. de Psicobiologia / Universidade  
Federal de São Paulo, UNIFESP Rua Napo-  
leão de Barros, n. 925 - Vila Clementino  
São Paulo-SP

**03.165**

INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E AGO-  
NISTA GABAÉRGICO NO LABIRINTO EM  
CRUZ ELEVADO

Ferri, M.K., Dalprá, W.L., Azeredo, L.A.,  
Souza, M.F., Couto-Pereira, N.S., Nin, M.S.,  
Barros, H.M.T.

Departamento de Farmacologia, UFCSPA  
R. Sarmento Leite, 245

### Fisiopatologia das doenças cardiovasculares

**12.035**

BETA2-ADRENOCEPTORS PLAY A ROLE IN  
PREVENTING SKELETAL MUSCLE ATROPHY  
OF ISCHEMIA-INDUCED HEART FAILURE  
MICE.

Voltarelli, V.A., Bacurau, A.V.N., Mattos,  
K.C., Brum, P.C.

Escola de Ed. Física e Esporte - Universidade  
de São Paulo, EEFE - USP Av. Prof.º Mello  
Moraes, 65 - Butantã

**12.036**

PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA  
MANUTENÇÃO DA RESPOSTA VASO-  
CONSTRITORA EM AORTAS DE RATAS  
DIABÉTICAS.

Sartoretto, SM, Akamine, EH, Tostes, RC,  
Carvalho, MHC, Fortes, ZB

Farmacologia/USP Instituto de Ciências  
Biomédicas, ICB Av. Prof. Lineu Prestes,  
1524

**12.037**

O EFEITO NA MODULAÇÃO AUTONÔMI-  
CA CARDÍACA POR INJEÇÃO SISTÊMICA  
DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE ME-  
DULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS COM  
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA.

Machado, M. P. R., Morais, S. D. B. V.,  
Rocha, A. M., Paiva, L. H., Ramiez, L. E.,  
Silva, E. L., Silva, V. J. D.

Universidade Federal Do Triângulo Minei-  
ro, UFTM Praça Manoel Terra, 330 Bairro:  
Abadia

**12.038**

ATORVASTATINA INIBE A ANGIOGÊNESE  
INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS  
ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE VEGF,  
TNF-A E TGF-B1

Araújo, F.A.<sup>1,3,2</sup>, Rocha, M.A.<sup>1</sup>, Mendes, J.B.<sup>1</sup>,  
Andrade, S.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e biofísica/  
UFMG, UFMG Antonio Carlos 6627 - ICB  
Bloco D4 sala 256- Pampulha - BH <sup>2</sup> Enfer-  
magem-Faculdade da saúde e ecologia hu-  
mana, FASEH Rua São Paulo, 958 -Jardim  
Alterosa - Vespasiano/MG <sup>3</sup> UEFI/Centro  
Universitário de Sete Lagoas, UNIFEMM  
Av. Marechal Castelo Branco, 2765- Sete  
Lagoas - MG

**12.039**

THE EFFECTS OF CHRONIC HEART FAILURE  
ON RESPIRATORY MECHANICS IN RATS

Pacheco, D. M.<sup>1</sup>, Silveira, V. D.<sup>2</sup>, Thomaz,  
A.<sup>2</sup>, Nunes, R. B.<sup>1</sup>, Dall'ago, P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia Cardiovascular,

UFCSPA Sarmento Leite, 245/308 - Porto  
Alegre, RS <sup>2</sup> Centro Universitário La Salle  
- Curso de Fisioterapia, UNILASALLE Ca-  
noas, RS

**12.040**

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
TCP2B DE TRYPANOSOMA CRUZI EM CA-  
MUNDONGOS DUPLO TRANSGÊNICOS.

Lago, V.M.<sup>1</sup>, Guerra, B.M.B.<sup>1</sup>, Lessa, J.JR.<sup>1</sup>, An-  
dreeva, L.<sup>3</sup>, Dvoryanchikov, G.<sup>3</sup>, Serova, I.<sup>4</sup>,  
Almeida, N.A.S.<sup>1</sup>, Rocha, N.N.<sup>2</sup>, Dias, L.P.B.<sup>1</sup>,  
Campos de Carvalho, A.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-  
UFRJ, UFRJ Av.Brigadeiro Trompowski s/n  
- CCS- UFRJ <sup>2</sup> Universidade Federal Flumi-  
nense, UFF Rua Marquês do Paraná 303 - 4º  
andar. <sup>3</sup> Institute of molecular Genetics, ICG  
Moscow-Russia <sup>4</sup> Institute of Cytology and  
Genetics, ICG Novosibirsk, Russia

**12.041**

TRATAMENTO CRÔNICO COM OUBAÍNA  
REDUZ A FORÇA, AUMENTA A ATIVIDADE  
DA NA+K+ATPASE, E REDUZ A ATIVIDADE  
DA ATPASE MIOSÍNICA EM MIOCÁRDIO  
DE RATOS

Meira, EF<sup>1</sup>, Batista PR<sup>1</sup>, Ribeiro-Junior, R<sup>2</sup>,  
Fernandes A.A.<sup>1</sup>, Siman, FDM<sup>1</sup>, Vassallo  
DV<sup>1,2</sup>, Padilha A.S.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Escola Superior de Ciências da Santa  
Casa de Misericórdia, EMESCAM Av. Nossa  
Senhora da Penha 2190 Santa Luiza Vitória  
ES <sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciên-  
cias Fisiológicas, PPGCF-UFES Av. Marechal  
Campos nº1468 Maruipe - Vitória ES

**12.042**

FREQUÊNCIA CARDÍACA E SUA MODULA-  
ÇÃO AUTONÔMICA EM RATOS MALNU-  
TRIDOS EM DIFERENTES IDADES

Sant'Helena, B.R.M.<sup>1</sup>, Falcão, E.P.<sup>1</sup>, Vas-  
concelos, T.<sup>1</sup>, Pessoa, C.R.V.<sup>1</sup>, Oliveira,  
H.T.<sup>1</sup>, Brasileiro-Santos<sup>2</sup>, Duarte, D.P.F.<sup>1</sup>,  
Da Costa, C.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e Farmaco-  
logia, UFPE Cidade Universitária Recife <sup>2</sup>  
Departamento de Fisioterapia, UFPE Cidade  
Universitária -Recife

**12.043**

ANÁLISE DA MODULAÇÃO AUTONÔMICA  
DA FREQUENCIA CARDÍACA (FC) A PARTIR  
DA ARRITMIA SINUSAL RESPIRATÓRIA EM  
HOMENS COM DOENÇA ARTERIAL CO-  
RONARIANA (DAC) E SAUDÁVEIS

Souza, R.B.<sup>1</sup>, Kunz, V.C.<sup>2</sup>, Rebelo, A.C.S.<sup>2</sup>,  
Tamburus, N.Y.<sup>1</sup>, Facirolli, K.<sup>1</sup>, Moreno,  
M.A.<sup>1</sup>, Silva, E.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Depto Fisioterapia, Faculdade de Ciências  
da Saúde, UNIMEP Rod do Açúcar, Km 156,  
Taquaral, Piracicaba-SP, CEP 13400901 <sup>2</sup>  
Depto de Fisioterapia, Universidade Federal  
de São Carlos, UFSCar Rod Washington  
Luis.Km 235, Monjolinho, São Carlos, SP,  
CEP 13565905

**12.044**

EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE TREINA-  
MENTO FÍSICO SOBRE O PERFIL LIPÍDICO  
DE INDIVÍDUOS DE MEIA IDADE

Gáspari, A. F.<sup>1</sup>, Libardi, C. A.<sup>1</sup>, Rocha, J.<sup>1</sup>,  
Madruga, V. A.<sup>1</sup>, Chacon-mikahil, M. P. T.<sup>1</sup>,  
Bernardes, C. F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia do Exercício - Edu-  
cação Física, UNICAMP Caixa Postal 6134  
- CEP 13083-851 - Campinas, SP <sup>2</sup> Bioquí-  
mica/CEATEC, PUC-Campinas Caixa Postal  
317 - CEP 13012-970 - Campinas, SP

**12.045**

SINOARTIC DENERVATION PREVENTS  
TRAINING-INDUCED PLASTICITY IN  
THE CENTRAL OXYTOCINERGIC (OT)  
SYSTEM.

**12.045**

SINOARTIC DENERVATION PREVENTS  
TRAINING-INDUCED PLASTICITY IN  
THE CENTRAL OXYTOCINERGIC (OT)  
SYSTEM.

## ATORVASTATINA INIBE A ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE VEGF, TNF- $\alpha$ E TGF- $\beta$ 1

Araújo, F.A.<sup>1,3,2</sup>, Rocha, M.A.<sup>1</sup>, Mendes, J.B.<sup>1</sup>, Andrade, S.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e biofísica/UFMG, UFMG

<sup>2</sup> Enfermagem-Faculdade da saúde e ecologia humana, FASEH

<sup>3</sup> UEFI/Centro Universitário de Sete Lagoas, UNIFEMM

**Palavras-chaves:** CCL2(MCP1/JE), colágeno, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , VEGF

### OBJETIVOS:

Angiogênese e inflamação são processos fisiopatológicos concomitantes que contribuem para a progressão e cronicidade de uma variedade de doenças. Assim, compostos que apresentam atividades anti-angiogênica e/ou inflamatória representam um potencial terapêutico. As estatinas são muito eficientes no tratamento da hipercolesterolemia e em desordens cardiovasculares. Neste trabalho avaliamos a influência da atorvastatina na modulação da angiogênese inflamatória.

### MÉTODO:

Discos de esponja implantados no dorso de camundongos Swiss machos (30-35g) anestesiados, foram utilizados para induzir a formação do tecido fibrovascular. Os animais divididos em 3 grupos receberam diferentes doses de atorvastatina (controle; 0,6 e 3 mg/kg) na água de beber por 9 dias sendo eutanasiados no 9º dia pós-implantação. Os implantes foram removidos e processados para dosagem de hemoglobina-Hb (índice vascular); mieloperoxidase-MPO (recrutamento de neutrófilos) n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase-NAG (recrutamento de macrófagos), colágeno (tecido fibroso) e citocinas (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MCP-1).

### RESULTADOS:

A atorvastatina (0,6 e 3mg/kg) não causou redução significativa nos níveis séricos do colesterol total. Os marcadores angiogênicos foram inibidos pela atorvastatina em ambas as doses ( $\square$ g Hb/mg peso úmido: 0,5 $\pm$ 0,07; 0,4 $\pm$ 0,07 n=10), e VEGF (0,2 $\pm$ 0,06; 0,3 $\pm$ 0,06 n=10) comparados aos valores do grupo controle controle (Hb 1,0 $\pm$ 0,15; VEGF 0,5 $\pm$ 0,09 n= 10). A atividade de MPO não foi afetada pelo tratamento com atorvastatina (2,97 $\pm$ 0,31 controle vs 2,50 $\pm$ 0,30 0,6mg/kg e 2,94 $\pm$ 0,18 3,0mg/kg n=10). No entanto, o composto em ambas as doses reduziu a atividade de NAG (4,40 $\pm$ 0,65 controle vs 0,91 $\pm$ 0,13 0,6mg/kg e 0,74 $\pm$ 0,12 3,0mg/kg n=10) e os níveis de TNF- $\alpha$  (0,09 $\pm$ 0,01 controle vs 0,04 $\pm$ 0,007 0,6mg/kg e 0,04 $\pm$ 0,005 3,0mg/kg n=10) e MCP-1 (1,77 $\pm$ 0,12 controle vs 1,35 $\pm$ 0,05 0,6mg/kg e 1,57 $\pm$ 0,07 3,0mg/kg n=10) nos implantes. A fibrogênese também foi inibida pela atorvastatina pela redução de colágeno e de TGF- $\beta$ .

### CONCLUSÃO:

A Atorvastatina, com o tratamento proposto, foi eficaz em inibir a angiogênese, inflamação e fibrose induzida pelo implante de esponja. Esses efeitos são modulados por citocinas e independentes da redução sérica do colesterol.

Apoio Financeiro: CNPq

# 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](#)