



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IANA MAYANE MENDES NICÁCIO VIANA

**EFEITOS DA AÇÃO CONJUNTA DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA E DA QUIMIOCINA CC-LIGANTE 2 SOBRE A  
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Maceió - AL

2013

IANA MAYANE MENDES NICÁCIO VIANA

EFEITOS DA AÇÃO CONJUNTA DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA E DA QUIMIOCINA CC-LIGANTE 2 SOBRE A  
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Salete Smaniotto

Maceió – AL

2013

**Catálogo na fonte**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

V614e Viana, Iana Mayane Mendes Nicácio.  
Efeitos da ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina e da quimiocina CC-ligante 2 sobre a migração de células endoteliais / Iana Mayane Mendes Nicácio Viana. – 2013.  
82 f. : il.

Orientadora: Saete Smaniotto.  
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 68-82.

1. IGF-1. 2. Migração endotelial. 3. Quimiocina CCL2. 4. Angiogênese.  
I. Título.

CDU: 616.13



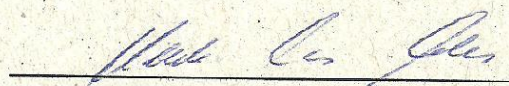
Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

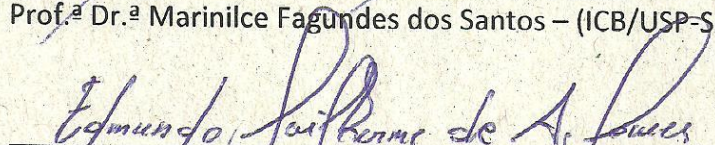
ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

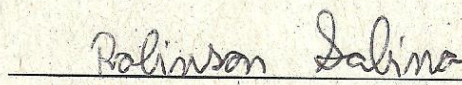
Defesa da Dissertação de Mestrado da mestrandia Iana Mayane Mendes Nicácio Viana, intitulada: “Efeitos da ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina e da quimiocina CC-ligante 2 sobre a migração de células endoteliais”, orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Salete Smaniotto, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 13 de março de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:

  
Prof.ª Dr.ª Marinilce Fagundes dos Santos – (ICB/USP-SP)

  
Prof. Dr. Edmundo Guilherme de Almeida Gomes - (FAMED/UFAL)

  
Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – (ICBS/UFAL)

*Dedico este trabalho ao Deus trino que tanto se fez presente com Seu cuidado e divina inspiração e que sendo capaz de enxergar minhas dificuldades, quando ninguém mais o faria, proporcionou que eu chegasse até aqui, ao colocar ao meu lado uma família presente e atenciosa: meus pais Ivan e Miran e meus irmãos Ivea e Ives, em quem sempre poderei confiar e esperar, sem se esquecer de me rodear com a companhia de verdadeiros amigos, rochas de sustentação que me dão forças para vencer os desafios.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela conclusão deste trabalho, pois sem Ele não conquistaria essa vitória dia a dia e as tantas outras que Ele tem preparado para mim.*

*A minha família pelo alicerce e dedicação na minha busca pela formação como Mestre, dando-me todo o apoio que sempre precisei e precisarei na vida.*

*A amizade valiosa de Lidiane Santos, Rafael Bezerra, Rômulo Alves, Mykaella Araújo, Nathalie Louise e Ozileudiane Barros, que se tornaram meus amigos antes ou durante a graduação. Agradeço pelo companheirismo e incentivo, pelos bons momentos de descontração, mas principalmente pelos seus bons conselhos que me ajudaram a superar os obstáculos nos momentos difíceis.*

*A amizade, companheirismo e orientação da professora Salete Smaniotto que com compromisso, confiança, dedicação e estímulo contribuiu para a minha formação acadêmica desde a graduação. A esta orientadora a qual admiro não apenas pelo exemplo profissional, mas principalmente pelo exemplo de pessoa.*

*A professora Silvana Ayres pela amizade, apoio e as conversas sempre regadas de muita alegria.*

*Aos amigos que fizeram parte ou ainda fazem do Laboratório de Biologia Celular, com os quais pude compartilhar e aprender conhecimentos importantes durante a jornada árdua de mestranda, em que agradeço pelo interesse e apoio demonstrado: Larissa Vieira, Rebeka Raísa Souza, Almair de Araújo, Altair Brandão, Navylla Candeia e em especial a Marvin Paulo Lins, Maíra Estanislau Soares de Almeida e Danielma Reis por terem sido tão prestativos no desenvolvimento deste projeto. Espero sempre manter esse vínculo, mas certamente da minha memória ele não se apagará.*

*A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Celular: Yngrid Santos, Isabela Maria, Genilda Castro, Robinson Sabino, Rafael Vital, Laís Agra, Fernanda Lima, Alex Wanderley e aos demais participantes meus sinceros agradecimentos.*

*Aos amigos de mestrado Simone Dias, Larissa Isabela, Lucas José, Mauricio Aquino, Nedja Medeiros, Rita de Cássia, Thalita Sales, Thycia Cerqueira, assim como os outros pelos inesquecíveis momentos de descontração e fraternização, muito importantes para aliviar a carga de responsabilidades a serem cumpridas.*

*Aos órgãos Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.*

*Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa e à Universidade Federal de Alagoas pelo apoio institucional.*

## RESUMO

A influência do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e da quimiocina CC-ligante 2 (CCL2) na função vascular e na angiogênese tem sido alvo de vários estudos que demonstram o efeito proangiogênico destas citocinas. Sabendo que a migração de células endoteliais pode ser estimulada pelos fatores angiogênicos e buscando compreender a interação destes fatores no processo de migração endotelial, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos *in vitro* do IGF-1 e/ou CCL2 sobre as células endoteliais. Para o estudo, a linhagem de células endoteliais tímicas murinas (tEnd.1) foram tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas. Análise por citometria de fluxo mostrou que o tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2 não alterou a expressão do receptor de IGF-1 (IGF-1R) nas células tEnd.1, quando comparado às culturas não tratadas. Entretanto, o tratamento com a CCL2 aumentou a expressão do seu receptor, o CCR2, nas células tEnd.1. Análise por imunofluorescência revelou que o IGF-1 e/ou a CCL2 estimularam a deposição de fibronectina (FN) nas células tEnd.1, porém, não alteraram a expressão de receptores para FN, a cadeia alfa da integrina  $\alpha 5\beta 1/VLA5$  (CD49e) e o proteoglicano transmembranar CD44 quando analisados por citofluorimetria. Por imunofluorescência também foram observadas alterações no citoesqueleto de F-actina das células aderidas sobre fibronectina em todos os tratamentos. No ensaio de adesão, as células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2 aumentaram a adesão à superfície revestida por fibronectina, bem como a migração endotelial em câmaras de *transwell* frente a fibronectina. A análise morfológica demonstrou que apenas as células tratadas com o IGF-1/CCL2 por 12 e 24 horas evidenciaram lúmens intracelulares. Finalmente, a área do lúmen e a formação de estruturas semelhantes a capilares foi aumentada pelo tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2 em células endoteliais cultivadas sobre fibronectina. Estes dados sugerem que o IGF-1 e a CCL2 estimulam *in vitro* a reorganização do citoesqueleto, adesão, migração e formação de estruturas semelhantes a capilares pela linhagem de células endoteliais tímicas frente à matriz de fibronectina, podendo assim contribuir para o processo de angiogênese.

**Palavras-chave:** IGF-1. Migração endotelial. Quimiocina CCL2. Angiogênese.



## ABSTRACT

The influence of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and CC-chemokine ligand 2 (CCL2) on vascular function and angiogenesis have been the subject of several studies which demonstrate their proangiogenic effects. Knowing that endothelial cell migration can be stimulated by angiogenic factors and seeking to understand the interaction of these factors in endothelial migration process, the present study aimed to investigate *in vitro* effects of IGF-1 and/or CCL2 on endothelial cells. We applied the murine thymic endothelial cell line (tEnd.1) treated with IGF-1 (100 ng/mL), CCL2 (10 ng/mL) or IGF-1/CCL2 for 24 hours. Flow cytometry analysis showed that treatment with IGF-1 and/or CCL2 did not change IGF-1 receptor expression (IGF-1R) on tEnd.1 cells as compared to untreated cultures. However, CCL2-treatment increased expression of its receptor, CCR2, on tEnd.1 cells. Immunofluorescence analysis of tEnd.1 cells revealed that IGF-1 and/or CCL2 increased fibronectin (FN) deposition, but they did not alter FN receptors, alpha chain of  $\alpha 5\beta 1$ /VLA5 integrin (CD49e) and CD44 transmembrane proteoglycan as analyzed by flow cytometry. By Immunofluorescence was also revealed alterations on F-actin cytoskeleton in these cells for all treatments onto fibronectin coating. In the adhesion assay, tEnd.1 cells treated with IGF-1 and/or CCL2 increased adhesion to fibronectin coated-surfaces as well as cell migration in transwell chambers assessed on fibronectin coated-surface. Morphological analysis demonstrated that only tEnd.1 cells treated with IGF-1/CCL2 for 12 and 24 hours presented intracellular lumens. Finally, luminal area and tEnd.1 tube formation were increased by IGF-1 and/or CCL2 treatment on fibronectin. These data suggest that IGF-1 and/or CCL2 stimulate *in vitro* cytoskeleton reorganization, adhesion, migration and endothelial cell tube formation by tEnd.1 cell line on fibronectin matrix protein, so they can contribute for angiogenesis process.

**Key-words:** IGF-1. Endothelial migration. CCL2 chemokine. Angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletromicrografia de um capilar contínuo .....	17
Figura 2 - Processos de vasculogênese e angiogênese .....	21
Figura 3 - Processos de protrusão e contração durante a migração celular.....	25
Figura 4 - Estrutura tetramérica do receptor IGF-1R .....	28
Figura 5 - Elementos-chave do sistema de moléculas envolvidas na regulação dos IGFs. ....	30
Figura 6 - Classes de quimiocinas.....	31
Figura 7 - Ação direta/indireta da CCL2 sobre a angiogênese. ....	33
Figura 8 - Efeitos da CCL2 na viabilidade das células tEnd.1 .....	41
Figura 9 - Morfologia das células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2....	43
Figura 10 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na expressão de seus receptores por células tEnd.1 .....	45
Figura 11 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na deposição de fibronectina por células endoteliais tímicas.....	47
Figura 12 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na expressão de receptores para fibronectina por células tEnd.1 .....	48
Figura 13 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 no citoesqueleto de F-actina de células endoteliais tímicas.....	50
Figura 14 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na adesão de célula-matriz extracelular.....	51
Figura 15 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na migração de células tEnd.1 através da membrana do <i>transwell</i> .....	53
Figura 16 - Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais tímicas .....	54
Figura 17 - Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares e área do lúmen sobre revestimento de fibronectina .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAEC	Células endoteliais de aorta bovina
bEnd.3	Linhagem de células endoteliais cerebrais
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BSA	Albumina sérica bovina
CCL2	Quimiocina CC-ligante 2
CCL11	Quimiocina CC-ligante 11
CCL15	Quimiocina CC-ligante 15
CCL23	Quimiocina CC-ligante 23
CCR2	Receptor de quimiocina CC-ligante 2
CD49e	Subunidade $\alpha 5$ da integrina
CD44	Proteoglicano transmembranar
CMF	Livre de cálcio e magnésio
CTR	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECM gel	Gel de matriz extracelular
ECV304	Linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano
ED50	Dose que produziu o efeito desejado em 50% da população
EDTA	Ácido etildiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
ELR	Domínio de glutamina, leucina e arginina
EPM	Erro padrão da média
ESC	Estruturas semelhantes a capilares
FAK	Proteína tirosina-quinase de adesão focal
FITC	Isocianato de fluoresceína
FN	Fibronectina
FT	Fator tecidual
GAR-FITC	Isocianato de fluoresceína conjugado a anticorpo de cabra anti-coelho
GH	Hormônio do crescimento
GRK	Quinases de receptores acoplados à proteína G
GTPase	Guanosina trifosfatase
HCEC	Células epiteliais da córnea humana

HEPES	Ácido hidroxietil piperazinaetanosulfónico
HMEC	Células endoteliais da microvasculatura dérmica
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IGF-1	Fator-1 de crescimento semelhante à insulina
IGF-2	Fator-2 de crescimento semelhante à insulina
IGF-1R	Receptor do fator-1 de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteínas ligantes ao fator de crescimento semelhante à insulina
IR	Receptor de insulina
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MTT	Sal de tetrazólio
NO	Óxido nítrico
NK	Células <i>natural killer</i>
NSILA	Atividade semelhante à da insulina não-suprimível
PBS	Solução salina tamponada
PE	Ficoeritrina
PerCP	Complexo proteína clorofila peridina
PHEM	Tampão de Pipes, Hepes, EGTA e MgCl <sub>2</sub>
Pipes	Ácido 1,4-Piperazinedietanosulfônico
RNA	Ácido ribonucléico
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Sulfato dodecil de sódio
SM	Somatomedina
SMC	Células de músculo liso de aorta torácica murina
tEnd.1	Linhagem de células endoteliais tímicas
TGF-β1	Fator-1 de crescimento transformante β
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
VSMC	Células musculares lisas vasculares

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>3.1</b>	<b>Célula endotelial</b> .....	16
3.1.1	Propriedades funcionais .....	17
3.1.2	Angiogênese e vasculogênese .....	19
3.1.3	Matriz extracelular e migração celular .....	21
<b>3.2</b>	<b>Papel do IGF-1 e da quimiocina CCL2 em células endoteliais</b> .....	26
3.2.1	Fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) .....	26
3.2.2	Quimiocinas .....	30
3.2.2.1	Quimiocina CC-ligante 2 .....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
<b>4.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	34
<b>4.2</b>	<b>Anticorpos</b> .....	34
<b>4.3</b>	<b>Linhagem de células</b> .....	35
<b>4.4</b>	<b>Padronização da cultura de células</b> .....	35
<b>4.5</b>	<b>Tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2</b> .....	35
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular por MTT</b> .....	36
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de análise morfológica</b> .....	36
<b>4.8</b>	<b>Ensaio de imunocitoquímica</b> .....	37
<b>4.9</b>	<b>Ensaio de citometria de fluxo</b> .....	37
<b>4.10</b>	<b>Coloração direta do citoesqueleto de F-actina por faloidina-Alexa 488</b> .....	38
<b>4.11</b>	<b>Ensaio de adesão celular</b> .....	38
<b>4.12</b>	<b>Ensaio de migração endotelial em câmara de <i>transwell</i></b> .....	39
<b>4.13</b>	<b>Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares</b> .....	40
<b>4.14</b>	<b>Análise estatística</b> .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41
<b>5.1</b>	<b>Efeitos da CCL2 sobre a viabilidade de células endoteliais</b> .....	41

<b>5.2</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a morfologia de células endoteliais</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a expressão de seus receptores em células endoteliais</b> .....	<b>44</b>
<b>5.4</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a deposição de fibronectina por células endoteliais</b> .....	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a expressão de receptores para fibronectina em células endoteliais</b> .....	<b>48</b>
<b>5.6</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre o citoesqueleto em células endoteliais</b> .....	<b>49</b>
<b>5.7</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a adesão célula-matriz extracelular</b> .....	<b>51</b>
<b>5.8</b>	<b>Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a migração de células endoteliais</b> .....	<b>52</b>
<b>5.9</b>	<b>Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As células endoteliais revestem internamente os vasos sanguíneos e possuem atividades essenciais no controle das funções vasculares. Elas também desempenham papel importante na formação de novos vasos sanguíneos e restauração de vasos lesados (SUMPIO et al., 2002).

Estas células estão normalmente em estado de quiescência, refletindo a estabilidade e integridade da parede vascular (SCHNAPER et al., 1993). Durante uma série de processos fisiológicos ou patológicos que envolvem a angiogênese, como o desenvolvimento embrionário, a inflamação, a cicatrização de ferida e o crescimento de tumor (FOLKMAN; SHING, 1992), este estado de repouso é alterado e as células endoteliais tornam-se alongadas, altamente móveis e sensíveis à estimulação por fatores de crescimento (GUVAKOVA, 2007).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) correspondem a uma das principais citocinas que regulam o processo de vascularização (HELLSTRÖM et al., 2001; DAVIS et al., 2002). Os IGFs circulantes ou produzidos localmente também participam na regulação da proliferação celular, diferenciação e inibição da apoptose (RUTANEN, 2000).

Dentre os IGFs, o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) caracteriza-se por ser um polipeptídeo simples com homologia estrutural ao fator-2 de crescimento semelhante à insulina (IGF-2) e a pró-insulina (DAUGHADAY et al., 1987; RAJARAM et al., 1997). É produzido por diversos órgãos, principalmente pelo fígado quando estimulado pelo hormônio do crescimento (GH) e tem a maioria dos seus efeitos mediados através do receptor IGF-1R, presente em uma grande variedade de tipos celulares (JONES; CLEMMONS, 1995).

Dados da literatura demonstram que o IGF-1 é capaz de estimular a função endotelial, ao potencializar a migração da linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano (ECV304) (IKEO et al., 2001), e promover a diferenciação, a migração e a habilidade das células progenitoras endoteliais humanas e murinas em formar estruturas semelhantes a capilares (THUM et al., 2007).

As quimiocinas também são apontadas como moduladoras da função endotelial, sendo atribuído à quimiocina CC ligante-2 (CCL2), um papel direto sobre

a angiogênese através de seu receptor CCR2 (SALCEDO et al., 2000; HWANG et al., 2004).

A ação sinérgica da CCL2 ou do IGF-1 com outros fatores de crescimento sobre o processo de angiogênese tem sido alvo de estudos. Segundo Hellström e colaboradores (2001), o IGF-1 em níveis mínimos mostrou-se necessário para promover a máxima função do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) na vascularização normal da retina, assim como a CCL2 modulou a formação de estruturas semelhantes a capilares de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas pelo VEGF (YAMADA et al., 2003).

Estudos comprovam que o IGF-1 e a CCL2 agem como mediadores proangiogênicos. Contudo, não há estudos na literatura científica que demonstram os mecanismos celulares promovidos pela interação destas citocinas sobre as células endoteliais. Sabendo-se que os fatores angiogênicos estimulam a migração de células endoteliais (STAMATOVIC et al., 2006), e tendo em vista que o processo migratório é dependente da interação da matriz extracelular-integrinas-citoesqueleto (QIN; ZHANG, 2010), tem-se despertado o interesse na compreensão da ação conjunta destes fatores proangiogênicos em processos envolvidos na migração endotelial.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Estudar *in vitro* os efeitos da ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e a quimiocina CCL2 na migração de células endoteliais derivadas de timo murino.

### **2.2 Específicos:**

- Analisar a morfologia das células endoteliais após o tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2;
- Analisar os efeitos da ação conjunta do IGF-1 e/ou CCL2 na expressão de seus receptores em células endoteliais;
- Avaliar os efeitos do IGF-1 e/ou CCL2 na expressão da fibronectina e seus receptores pelas células endoteliais;
- Analisar os efeitos do IGF-1 e/ou CCL2 sobre a organização do citoesqueleto das células endoteliais;
- Avaliar a ação do IGF-1 e/ou CCL2 sobre a adesão e migração da célula endotelial;
- Analisar a ação do IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Célula endotelial

As células endoteliais são versáteis, multifuncionais e apresentam propriedades sintéticas e metabólicas importantes para uma série de processos biológicos que regulam a homeostasia como a angiogênese, a vasculogênese, e as respostas imunes e reações inflamatórias (SUMPIO et al., 2002).

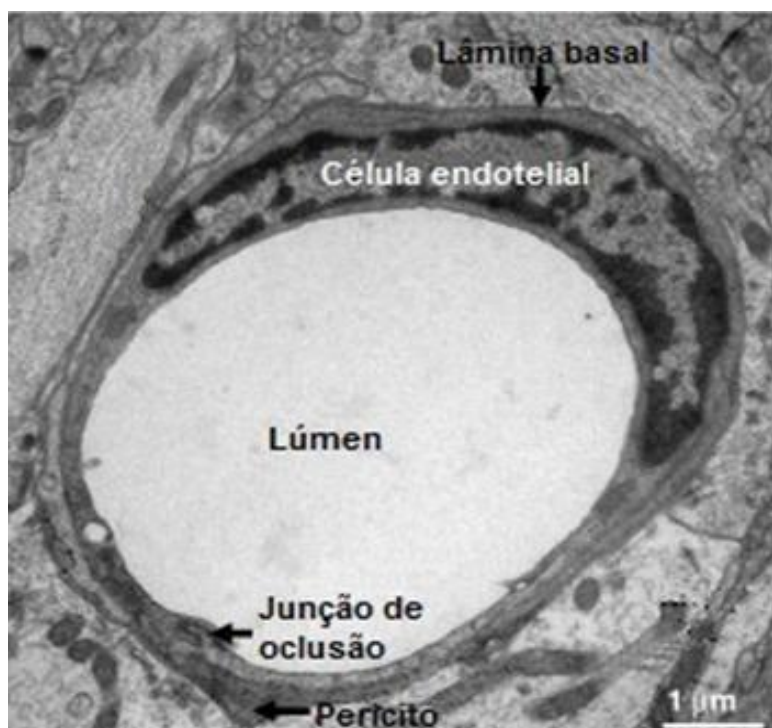
A célula endotelial caracteriza-se por apresentar forma alongada, núcleo proeminente e organelas citoplasmáticas (Figura1). Em sua superfície apresenta invaginações submicroscópicas na membrana denominadas de cavéolas que podem conter moléculas sinalizadoras e receptores (NASCIMENTO et al., 2003). Estas células constituem células epiteliais polarizadas que apresentam uma superfície apical e uma superfície basal (KRAMER, 1985; SCHNAPER et al., 1993), e são estruturadas por complexos de junções intercelulares (LAMPUGNANI et al., 1995), que atuam na manutenção da integridade das células adjacentes, estabelecendo conexões célula-célula e sítios de adesão célula-substrato (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004).

As células endoteliais constituem a interface física entre a circulação sanguínea e os tecidos (CINES et al., 1998). Desta forma, elas apresentam a membrana luminal em contato direto com o sangue, e em contato com o espaço subendotelial encontram-se a membrana basal, constituída de matriz extracelular (MEC), pericitos, células musculares lisas e fibroblastos (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

A organização da membrana basal das células endoteliais nos vasos sanguíneos permite a identificação de tipos distintos de capilares. A principal distinção é a presença ou ausência de uma membrana basal contínua que classifica os capilares como contínuo ou sinusóide, respectivamente (BENNETT et al., 1959; SARIN, 2010). A descontinuidade na membrana basal dos sinusóides presente em órgãos como a medula óssea e o baço tornam menos restritiva a transmigração de células do sangue, sendo consistente com os papéis funcionais que estes órgãos desempenham na hematopoiese e na resposta imune, permitindo que os monócitos e fagócitos residentes no interior dos espaços intersticiais sejam

eficientemente mobilizados quando necessário (SARIN, 2010). Estes capilares são ainda sub-classificados como fenestrados ou não fenestrados com base na ausência ou presença de fenestrações no interior da camada endotelial (SARIN, 2010).

**Figura 1 – Eletromicrografia de um capilar contínuo.**



Fonte: Weiss et al., 2009 (Adaptado).

A célula endotelial do capilar caracteriza-se por apresentar forma alongada, núcleo proeminente e organelas citoplasmáticas.

### 3.1.1 Propriedades funcionais

O endotélio consiste em um órgão com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas presente nos leitos vasculares, porém este conceito foi aceito apenas na década de 1980, quando foi constatado que o endotélio não se tratava apenas de um tecido epitelial com funções passivas de revestimento dos vasos sanguíneos, mas que atuava diretamente no processo de vasodilatação (FURCHGOTT et al., 1984). Ainda, atualmente é reconhecido por participar na homeostasia vascular, regulando o tônus vascular, crescimento celular, fibrinólise, trombólise, resposta inflamatória e imune (COOKE, 2000; GALLARRETA et al., 2009).

Um endotélio vascular íntegro é essencial para o controle das funções vasculares e suprimento adequado de sangue para os tecidos do organismo, sendo a sua função primária essencial a manutenção da permeabilidade da parede vascular (CINES et al., 1998), que é constituída pela membrana basal e forma uma barreira secundária à passagem do plasma e constituintes celulares para o compartimento extravascular (JAFFE, 1987).

Através de sua capacidade de controlar o tônus vascular, o endotélio regula o fluxo do sangue pela liberação de componentes vasomotores como a endotelina que pode promover vasoconstrição ou componentes como a prostaciclina e o óxido nítrico que estimulam a vasodilatação (SUMPIO et al., 2002). Além disso, a regulação do fluxo sanguíneo é promovida pelas propriedades anti-trombogênicas e anti-adesivas das células endoteliais que asseguram a fluidez sanguínea, impedindo a aderência das células do sangue e o acúmulo destas nos vasos (STOLTZ et al., 2007). Isto se deve a secreção regulada de agentes antiplaquetários como a prostaciclina e o óxido nítrico (PEARSON, 1999), e a capacidade das células endoteliais de gerar uma superfície ativa anti-trombogênica pela expressão do heparan sulfato, um inibidor primário da trombina (FRANCO, 2001), que é o principal local de ligação da anti-trombina (CINES et al., 1998). A célula endotelial também produz e expressa o receptor endotelial trombomodulina (STOLTZ et al., 2007), que se liga a trombina e altera a sua especificidade catalítica, reduzindo sua capacidade de clivar o fibrinogênio, e ainda aumenta sua capacidade de ativar a proteína C anticoagulante (PEARSON, 1999; STOLTZ et al., 2007).

Durante a inflamação e tensão de cisalhamento, estas propriedades são reduzidas e as células endoteliais são estimuladas a secretar componentes pró-trombóticos e anti-fibrinolíticos (CINES et al., 1998; STOLTZ et al., 2007). Na presença de injúria, para que ocorra o reparo endotelial a matriz endotelial é exposta a adesão plaquetária que requer a presença do fator de von Willebrand, um produto da secreção das células endoteliais (PEARSON, 1999).

O endotélio também é crucial nas respostas imunes e reações inflamatórias (SUMPIO et al., 2002), pois age como uma barreira seletiva no recrutamento de leucócitos circulantes. Primariamente, os leucócitos aderem ao revestimento endotelial da parede do vaso, transmigram através da monocamada endotelial e

em seguida, migram de forma dirigida para o local da infecção ou lesão (LIU et al., 2004).

Dentre as propriedades desempenhadas pelas células endoteliais, a vasculogênese e a angiogênese são atividades cruciais que ocorrem desde a fase embrionária e se mantêm no indivíduo adulto (FISCHER et al., 2006). A vasculogênese corresponde à formação de vasos a partir da associação de células endoteliais precursoras (BECK; D'AMORE, 1997), que ocorre principalmente na fase embrionária (SUMPIO et al., 2002), enquanto no adulto os novos vasos são formados através da angiogênese, expansão contínua do sistema vascular (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; CINES et al., 1998).

### 3.1.2 Angiogênese e vasculogênese

A angiogênese corresponde à formação de novos vasos como resultado do brotamento de células endoteliais a partir de vasos pré-existentes como mostrado na Fig. 2 (FOLKMAN; SHING, 1992; CINES et al., 1998; GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000, SILVA et al., 2007). Este processo é essencial para o crescimento tecidual normal como a cicatrização de ferimentos, o desenvolvimento embrionário e o ciclo menstrual, em que novos vasos são formados para suprir os tecidos com oxigênio e nutrientes, como também remover os metabólitos (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000). No embrião, a angiogênese ocorre em regiões avasculares e no adulto ocorre mais comumente durante a cicatrização de ferimentos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; CINES et al., 1998). Contudo, várias patologias estão associadas à formação de novos vasos como o câncer, a aterosclerose, a artrite reumatóide e a retinopatia diabética (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

Em condições fisiológicas ou patológicas, o processo de angiogênese é iniciado pelo aumento local da permeabilidade do vaso sanguíneo e extravasamento de proteínas do plasma (HUTCHINGS et al., 2003). Além disso, o relaxamento vascular mediado pelo óxido nítrico é um pré-requisito para as células endoteliais entrarem na cascata angiogênica (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

A vasodilatação permite o alongamento dos vasos que se tornam sensíveis aos fatores de crescimento (FOLKMAN; SHING, 1992). Assim, a liberação de citocinas angiogênicas por várias fontes estimula a ativação das células endoteliais,

que penetram na MEC através da degradação da lâmina basal por meio da ação de metaloproteinases da matriz ou liberadas pelo endotélio (SILVA et al., 2007; GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

Sob a ação dos estímulos angiogênicos, as células endoteliais migram e proliferam para iniciarem o brotamento capilar, posteriormente se diferenciam, assumem a forma tubular e durante o estado de maturação formam uma nova lâmina basal (HUTCHINGS et al., 2003; SILVA et al., 2007). Os tubos microvasculares se unem por anastomose e originam a cadeia circulatória funcional (LIOTTA et al., 1991).

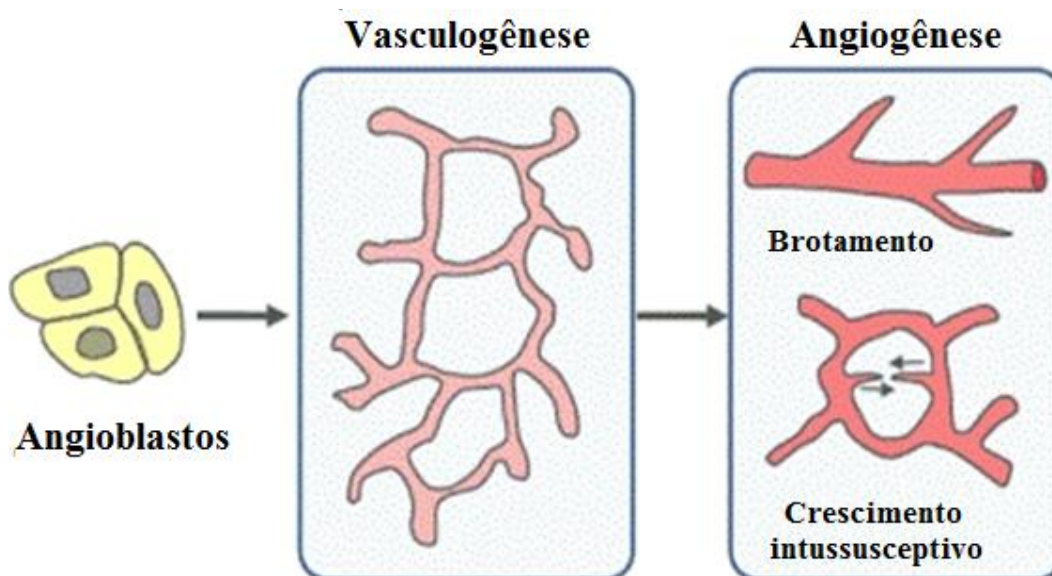
Os vasos também podem ser originados pelo processo de angiogênese intussusceptivo ou angiogênese por separação. Este ocorre quando a parede do vaso se estende para dentro do lúmen, fazendo com que o vaso se divida em dois sem que as células endoteliais dependam imediatamente da proliferação e migração celular (Fig. 2) (KURZ et al., 2003; ADAIR; MONTANI, 2010)

A vasculogênese corresponde à organização de células endoteliais em vasos na ausência de um sistema vascular pré-existente e ocorre principalmente na fase embrionária como mostrado na Fig. 2 (CINES et al., 1998). As células endoteliais maduras são originadas a partir de células precursoras denominadas de angioblastos (LAMALICE et al., 2007). Estes por sua vez, são originados dos hemangioblastos que se diferenciaram da linhagem de células mesodérmicas. Os hemangioblastos também podem originar as células da linhagem hematopoiética (SUMPIO et al., 2002).

As células endoteliais primitivas (angioblastos) e as células precursoras da linhagem hematopoiética se desenvolvem em conjunto, logo após a implantação do embrião dentro do saco vitelínico primitivo. Estas células coalescem para formar estruturas denominadas ilhas de sangue, também denominadas de hemangioblastos (RISAU et al., 1988). Tal estrutura é composta por uma camada externa de angioblastos que originam as células endoteliais maduras e uma camada interna, formada pelas células tronco hematopoiéticas responsáveis pela formação dos precursores das células sanguíneas (RISAU et al., 1988; RISAU; FLAMME, 1995; CINES et al., 1998). As ilhas de sangue se fundem para formar uma rede primitiva de túbulos conhecidos como plexo vascular ou capilar. A remodelação e a maturação do plexo vascular em uma rede circulatória requerem a

incorporação do tecido conjuntivo, o recrutamento de células musculares lisas e pericitos para formar a parede vascular sanguínea externa (NASCIMENTO et al., 2003; GOLDIE et al., 2008).

**Figura 2 - Processos de vasculogênese e angiogênese.**



Fonte: Carmeliet e Collen, 2000; Adair e Montani, 2010 (Adaptado).

A vasculogênese corresponde à formação de vasos a partir da associação de células endoteliais precursoras, enquanto a angiogênese é a expansão contínua do sistema vascular por brotamento ou intussuscepção.

### 3.1.3 Matriz extracelular e migração celular

A formação dos vasos sanguíneos pelas células endoteliais não requer apenas a regulação por fatores de crescimento angiogênicos, mas também interações com a MEC (CINES et al., 1998; WIJELATH et al., 2004). A matriz extracelular das células endoteliais é constituída principalmente por glicosaminoglicanos, proteínas como o colágeno e a elastina e glicoproteínas como a laminina, a fibronectina e a trombospondina (JAFPE, 1987).

Dentre os componentes da membrana basal das células endoteliais, a fibronectina caracteriza-se por ser uma das maiores moléculas produzidas, embora seja secretada em pequenas quantidades quando comparada a outros constituintes (JAFPE, 1987). As células endoteliais secretam a fibronectina como dímeros solúveis que são organizados em fibrilas insolúveis na superfície celular

(WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003), assim a FN quando presente no tecido conjuntivo mostra-se insolúvel e associada à membrana basal, mas no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais apresenta uma forma solúvel (HANSEN; CLEMMENSEN, 1982).

A montagem da matriz de FN é iniciada pela ligação da FN inativa com os receptores de superfície celular, principalmente a integrina  $\alpha 5 \beta 1$ . O *clustering* de integrinas recruta proteínas de sinalização e do citoesqueleto nos complexos focais e concomitantemente, forças de contração celular convertem a FN compacta e inativa em uma forma ativa estendida que expõem os locais para a interação FN-FN, iniciando assim a formação de fibrilas de FN (WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003).

Em vários tipos celulares a fibronectina estimula a adesão célula-MEC e contribui para o crescimento celular, citocinese e migração (MOSHER; FURCHT, 1981). Esta glicoproteína também apresenta em sua estrutura domínios de ligação para a fibrina, o colágeno, a heparina, a própria FN e para as moléculas de superfície celular (WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003).

A MEC não atua apenas como o suporte para as interações adesivas na superfície das células endoteliais com as integrinas, mas também atua no ancoramento destas células, mantendo a organização delas nos vasos sanguíneos (DAVIS; SENGER, 2005) e influenciando a morfologia e fisiologia endotelial (SILVA et al., 2007), essenciais para os processos de proliferação, migração, sobrevivência e estabilidade do vaso (DAVIS; SENGER, 2005). Desta forma, os aspectos funcionais da célula endotelial são influenciados pela MEC por meio de funções mecânicas e pela indução de transdução de sinais que medeiam a interação de seus componentes com os receptores integrinas. Ainda é proposto que a MEC mobiliza citocinas angiogênicas e coordena a sinalização destes ligantes com seus receptores (DAVIS; SENGER, 2005).

As integrinas são uma grande família de receptores transmembranares heterodiméricos compostos pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  associadas não covalentemente (SILVA et al., 2007). Cada subunidade é constituída por um domínio extracelular, uma única região transmembranar e uma região citoplasmática curta (HYNES, 2002; AVRAAMIDES et al., 2008). Elas não apresentam atividade quinase ativa ou enzimática, mas ativam complexas vias de



sinalização por estarem acopladas a quinases e proteínas adaptadoras em complexos de adesão focal (AVRAAMIDES et al., 2008).

As integrinas atuam como receptores de adesão para uma série de proteínas da MEC como a fibronectina, vitronectina, colágeno, laminina, fibrinogênio, trombospondina, osteoponina e fator von Willebrand (RUPP; LITTLE, 2001). Estes receptores têm como principais funções promover a adesão e migração da célula sobre a MEC (AVRAAMIDES et al., 2008), e por meio de sinalização regulam a expressão de genes, a morfologia, a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular (RUPP; LITTLE, 2001).

Algumas integrinas reconhecem seus ligantes através da sequência adesiva formada pelos aminoácidos arginina – glicina – ácido aspártico (PLOW et al., 2000; AVRAAMIDES et al., 2008). Dependendo da integrina, esta pode reconhecer vários ligantes ou ligar-se primariamente a um único ligante (AVRAAMIDES et al., 2008). Após a ligação das integrinas com seus ligantes ocorre um agrupamento destes receptores em sítios de adesão focal que estão associados externamente à MEC e internamente ao citoesqueleto (GEIGER et al., 2009; GIL et al., 2009).

Outras proteínas como os proteoglicanos transmembranares atuam como receptores para os componentes da MEC (FICHTER et al., 1997; COUCHMAN, 2010). Estas moléculas são constituídas por núcleo proteico ligado a cadeias de glicosaminoglicanos e podem se associar estreitamente com outros receptores como as integrinas e os receptores de fatores de crescimento, influenciando sua função (COUCHMAN, 2010).

As interações dos proteoglicanos transmembranares com a MEC permitem a ligação de linfócitos e células epiteliais aos componentes da matriz como o ácido hialurônico, a fibronectina e o colágeno (ARUFFO et al., 1990; JALKANEN; JALKANEN, 1992; STAMENKOVIC et al., 1991; FICHTER et al., 1997). Além de atuarem na adesão célula-matriz, os proteoglicanos também agem na interação célula-célula, na migração celular, na ativação e *homing* linfocitário, no crescimento tumoral e metástases (UNDERHILL, 1992; MACKAY et al., 1994; ZHU et al., 1997).

Como as integrinas, o proteoglicano CD44 atua como receptor, principalmente para o ácido hialurônico, e também pode sinalizar e associar-se ao citoesqueleto, interagindo com suas proteínas como a actina, anquirina e os

membros da família ERM (BOURGUIGNON; JIN, 1995; TSUKITA et al., 1994; FOGER et al., 2001; COUCHMAN, 2010).

A força motriz para o movimento celular é fornecida pela dinâmica reorganização do citoesqueleto de actina (NOBES; HALL, 1999). A reorganização do citoesqueleto é iniciada pela sinalização promovida pela integrina que leva a remodelação do citoesqueleto de actina através de GTPases da família Rho (AVRAAMIDES et al., 2008). A remodelação da actina propulsiona um fluxo citoplasmático na direção da migração celular, promovendo uma saliência na parte frontal da célula e retração na parte traseira como mostrado na Fig. 3 (NOBES; HALL, 1999; AVRAAMIDES et al., 2008).

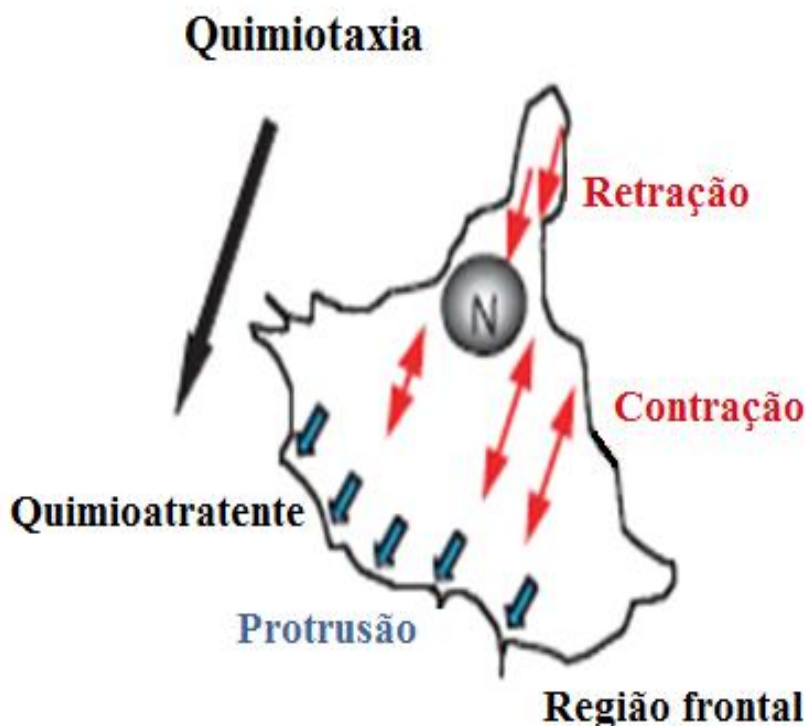
A migração depende da montagem e desmontagem dos complexos de adesão focal associados às integrinas. Estes complexos regulam a migração por promover a adesão, ligando a MEC ao citoesqueleto de actina, e a transdução de sinal, permitindo a expressão de moléculas envolvidas na motilidade celular (HUTTENLOCHER et al., 1995; CARY et al., 1996; COX et al., 2001).

No processo de migração podem ser identificadas quatro etapas mecanicamente distintas: extensão do lamelipódio, formação de novos complexos de adesão focal, contração do corpo celular e retração da cauda (RIDLEY et al., 2001). Nestes processos, estão envolvidas diretamente proteínas da família Rho GTPases como RhoA, Rac1 e Cdc42 (ALLEN et al., 1998; NOBES; HALL, 1999; RIDLEY et al., 2001; COX et al., 2001). Além disso, a ligação das integrinas à MEC leva a ativação das Rho GTPases e esta sinalização é um passo fundamental no processo de tubulogênese pelas células endoteliais (SACHARIDOU et al., 2012).

A primeira fase da migração consiste na formação do lamelipódio, uma extensão da membrana celular que é promovida por Rac1 (NOBES; HALL, 1995; NOBES; HALL, 1999; RIDLEY et al., 2001; COX et al., 2001). Posteriormente, Cdc42 e Rac1 sinalizam para a formação de novos complexos de adesão focal que medeiam a adesão do lamelipódio à MEC (NOBES; HALL, 1995; LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996). Após extensão do lamelipódio, o corpo celular contrai-se por ação do complexo actomiosina (MITCHISON; CRAMER, 1996) que pode ser regulado por Rho (RIDLEY et al., 2001). Por fim, a retração da cauda por deslocamento depende do tipo da célula e força de adesão à MEC (COX; HUTTENLOCHER, 1998; PALECEK et al., 1998; RIDLEY et al., 2001).

Outra estrutura essencial para a migração celular são os filopódios, extensões pequenas ao redor da célula, reguladas por Cdc42 e que são requeridas para a detecção da direção durante a quimiotaxia (ALLEN et al., 1998; NOBES; HALL, 1999; RIDLEY et al., 2001).

**Figura 3 - Processos de protrusão e contração durante a migração celular.**



Fonte: Etienne-Manneville e Hall, 2002 (Adaptado).

A remodelação da actina propulsiona um fluxo citoplasmático na direção da migração celular, promovendo uma saliência na parte frontal da célula e retração na parte traseira.

Durante a migração, gradientes de citocinas ou outros agonistas são requeridos para dirigir a migração quimiotática das células endoteliais ativadas (DAVIS; SENGER, 2005). Estas por sua vez, degradam a matriz extracelular e proliferam para iniciar o brotamento do vaso (GERHARDT et al., 2003; QUTUB; POPEL, 2009). Finalmente, o broto se une a um capilar adjacente (QUTUB; POPEL, 2009).

A maturação do vaso é seguida pela formação de lumens no interior dos cordões vasculares, para o transporte de sangue, e pelo estabelecimento de uma lâmina basal (DRAKE; LITTEL, 1999; DAVIS; SENGER, 2005). As citocinas

continuam a estimular a morfogênese tubular durante o processo de angiogênese e após o estabelecimento do vaso, agem como mediadores do recrutamento celular mural como promovido pela quimiocina CCL2 (APLIN et al., 2010).

### **3.2 Papel do IGF-1 e da quimiocina CCL2 em células endoteliais**

A relação entre a função endotelial e a sua regulação por fatores de crescimento e quimiocinas vem adquirindo importância crescente. Entre os fatores de crescimento, o IGF-1 destaca-se por apresentar ações pleiotrópicas versáteis e por atuar como um fator protetor para a vascularização (CONTI et al., 2004) e a quimiocina CCL2 atua de maneira importante na remodelação vascular como comprovado em estudos anteriores (CHARO; TAUBMAN, 2004; MA et al., 2007; APLIN et al., 2010).

#### **3.2.1 Fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)**

Inicialmente acreditava-se que o GH exercia uma ação direta sobre a taxa de crescimento dos tecidos, porém a descoberta do fator de sulfatação, um estimulante da incorporação de sulfato à cartilagem foi apontado como um mediador do crescimento promovido pelo GH, sendo subsequentemente nomeado de somatomedina (SM) (VAN DEN BRANDE, 1973; JONES; CLEMMONS, 1995; ETHERTON, 2004).

Estudos paralelos realizados para identificar fatores no soro que podiam estimular os efeitos semelhantes aos da insulina mostraram que suas ações não eram inibidas pela adição de anticorpo anti-insulina, sendo denominados de atividade semelhante à da insulina não-suprimível (NSILA) (FROESCH et al., 1966; JONES; CLEMMONS, 1995; ETHERTON, 2004). Em 1976, quando a sequência de NSILA foi identificada observou-se que ela apresentava 48% de homologia à proinsulina humana e que a SM e a NSILA apresentavam estruturas idênticas entre si e estrutura similar à insulina (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1978a; JONES; CLEMMONS, 1995). Baseados nestas evidências, NSILA foi nomeada fator-1 de crescimento semelhante à insulina e o surgimento de uma nova molécula similar,

mas não idêntica ao IGF-1 foi denominada fator-2 de crescimento semelhante à insulina (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1978b; JONES; CLEMMONS, 1995).

Com o advento da biologia molecular, uma variedade de técnicas analíticas novas tem sido aplicadas para a compreensão da funcionalidade do IGF-1 (JONES; CLEMMONS, 1995), que é um polipeptídeo simples com peso molecular de 7,5 kDa e apresenta sequência proteica com 68% de homologia com o IGF-2 e 50% de homologia com a sequência da pró-insulina (DAUGHADAY et al., 1987; RAJARAM et al., 1997). O IGF-1 é o produto de um único gene ( $\pm$  95 kb) que contém seis éxons. A transcrição deste gene leva à produção de RNA mensageiros com diferentes tamanhos que são expressos em uma variedade de tipos celulares, em que eles atuam como promotores da proliferação e diferenciação celular (VAN KLEFFENS et al., 1998).

Diversos órgãos produzem o IGF-1, contudo sua principal síntese ocorre no fígado, quando estimulado pelo GH (JONES; CLEMMONS, 1995). O GH através de seus efeitos diretos ou indiretos atua sobre o crescimento e metabolismo, mas foi através de estudos com culturas de células e modelos animais que se demonstrou que os efeitos indiretos eram principalmente mediados pelo IGF-1 (ETHERTON, 2004).

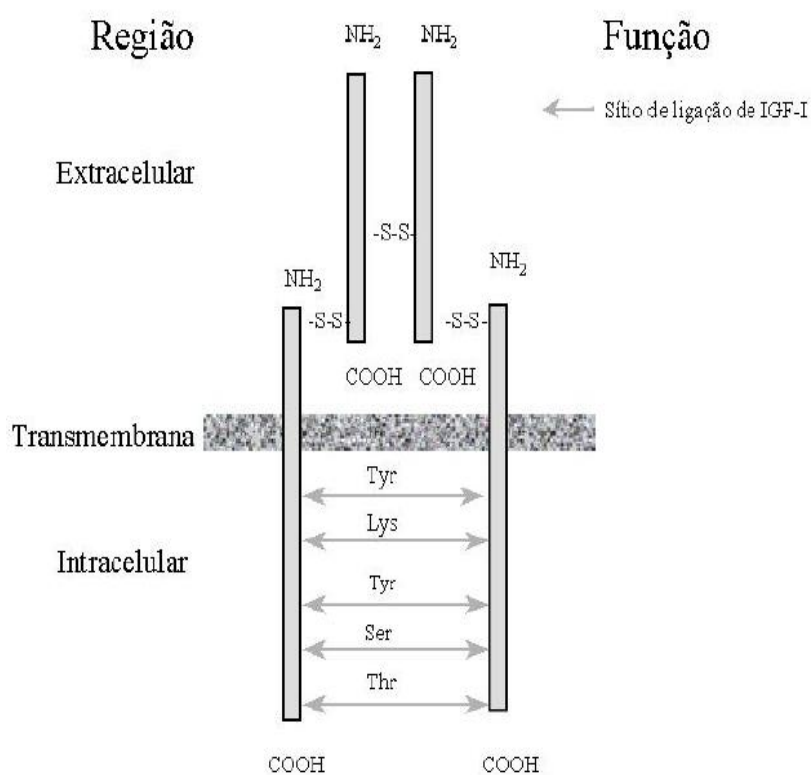
A maioria dos efeitos mediados pelo IGF-1 ocorre através de seu receptor, o IGF-1R (Figura 4). Este receptor consiste de uma glicoproteína de membrana que é constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . Estas quatro subunidades são ligadas por pontes dissulfetos que formam uma estrutura tetramérica, na qual a subunidade  $\alpha$  extracelular é responsável pela especificidade com o ligante, enquanto na subunidade  $\beta$  reside a atividade tirosina quinase (ULLRICH et al., 1986; PAPA et al., 1993; JONES; CLEMMONS, 1995). O IGF-1R está presente em uma grande variedade de tipos celulares o que permite a fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, queratinócitos, células neurais e células epiteliais tímicas responderem à estimulação pelo fator-1 de crescimento semelhante à insulina (JONES; CLEMMONS, 1995).

As células endoteliais também expressam o IGF-1R em sua superfície e o aumento deste receptor está associada ao aumento na reparação endotelial. (IMRIE et al., 2012). As células endoteliais humanas também podem expressar em sua superfície receptores híbridos (IR/IGF-1R) compostos por heterodímeros que

contêm uma cadeia  $\alpha\beta$  do receptor de insulina (IR) associada a uma cadeia  $\alpha\beta$  do IGF-1R (LI et al., 2005; MUNIYAPPA; SOWERS, 2012).

O IR/IGF-1R tem uma baixa afinidade para a insulina, mas se liga ao IGF-1 com a mesma afinidade que o IGF-1R. Em concentrações farmacológicas a insulina e o IGF-1 reagem de forma cruzada com o receptor um do outro, embora com uma afinidade significativamente mais baixa do que com os seus próprios receptores (BELFIORE et al., 2009; MUNIYAPPA; SOWERS, 2012).

**Figura 4 – Estrutura tetramérica do receptor IGF-1R.**



Fonte: Chaves, 2002.

Este receptor consiste de uma glicoproteína de membrana que é constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . Estas quatro subunidades são ligadas por pontes dissulfetos que formam uma estrutura tetramérica, na qual a subunidade  $\alpha$  extracelular é responsável pela especificidade com o ligante e na subunidade  $\beta$  transmembrana reside a atividade tirosina quinase.

Em outros tipos de células, a expressão do IGF-1R modula a sinalização da insulina através da alteração dos níveis de receptores híbridos (BELFIORE et al., 2009; MUNIYAPPA; SOWERS, 2012). Estudos recentes mostram que essa mesma

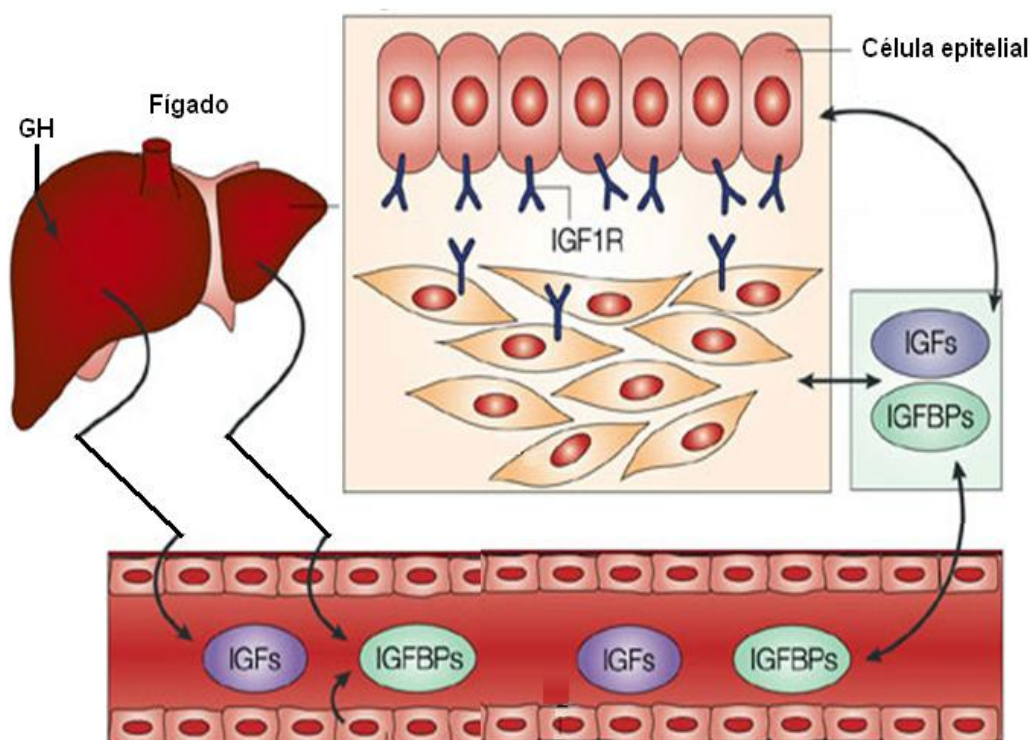
dinâmica afeta a sinalização da insulina em células endoteliais, pois a expressão maior de IGF-1R durante a formação dos híbridos modula as quantidades de IR/IGF-1R formadas, influenciando negativamente a estimulação de NO pela insulina (IMRIE et al., 2012; MUNIYAPPA; SOWERS, 2012).

A biodisponibilidade do IGF-1 é regulada por uma família de 6 proteínas principais ligantes ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs 1-6) que se ligam ao IGF-1 circulante no plasma. Estas proteínas apresentam a capacidade de facilitar ou não o acesso do fator de crescimento aos tecidos, podendo desta forma, modular a ação do IGF-1 tanto de maneira positiva como negativa (MURPHY, 1998; RAJARAM et al., 1997; CHAVES, 2002). A ação do IGF-1 também é modulada por um grupo de enzimas que atuam como proteases, clivando os complexos IGFBPs + IGF-1 e, portanto alternam a afinidade das IGFBPs ao IGF-1 e conseqüentemente aumentam a concentração da forma livre de IGF (JONES; CLEMMONS, 1995; RAJARAM et al., 1997) (Fig. 5).

A vascularização também é alvo dos efeitos fisiológicos exercidos pelo IGF-1 como o estímulo de propriedades vasomotoras e metabólicas, aumento da capacidade proliferativa e inibição da apoptose (DELAFONTAINE et al., 2004). A estimulação da síntese de DNA pelo IGF-1 é observada nas células que constituem a vasculatura como células endoteliais, pericitos e células de músculo liso (KING et al., 1985; JOHANSSON et al., 2008). Além disso, o IGF-1 age como vasodilatador, contribuindo para a regulação do tônus vascular e da pressão arterial sanguínea (HAYLOR et al., 1991; GILLESPIE et al., 1997; CHE et al., 2002; DELAFONTAINE et al., 2004), e como estímulo para a produção vascular de NO (WICKMAN et al., 2002; DELAFONTAINE et al., 2004).

O papel de IGF-1 como um mediador proangiogênico tem sido demonstrado pela literatura científica ao estimular o processo de angiogênese (NICOSIA et al., 1994; KONDO et al., 2003; SU et al., 2003), e atuar sobre as células endoteliais aumentando a capacidade migratória e a formação de estruturas semelhantes a vasos (NAKAO-HAYASHI et al., 1992; SHIGEMATSU et al., 1999).

**Figura 5 - Elementos-chave do sistema de moléculas envolvidas na regulação dos IGFs.**



Fonte: Pollak, 2008 (Adaptado).

O IGF1 circulante é produzido principalmente no fígado (sob o controle principalmente do GH). A biodisponibilidade desse fator de crescimento é regulada por uma família de 6 proteínas principais ligantes ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs 1-6) que se ligam ao IGF-1 circulante no plasma. A ação do IGF-1 também é modulada por um grupo de enzimas que atuam como proteases, clivando os complexos IGFBPs + IGF-1 e, portanto alternam a afinidade das IGFBPs ao IGF-1 e conseqüentemente aumentam a concentração da forma livre de IGF. A maioria dos efeitos mediados pelo IGF-1 ocorre através de seu receptor, o IGF-1R.

### 3.2.2 Quimiocinas

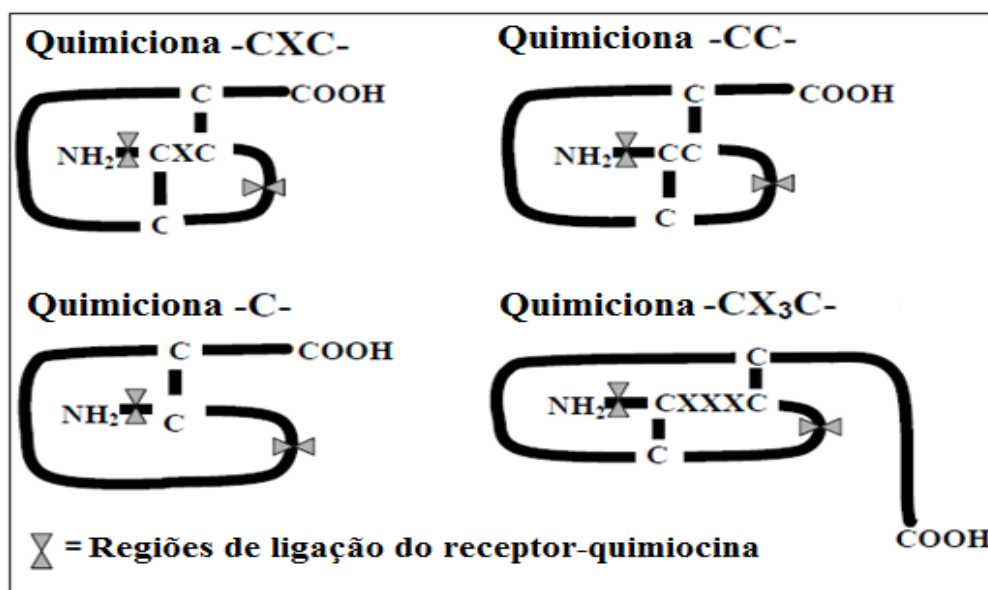
As quimiocinas compreendem uma larga família de citocinas envolvidas na regulação de eventos quimiotáticos como a migração de leucócitos, na imunidade e na hematopoiese (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000; WRIGHT et al., 2002; HWANG et al., 2004; HWANG et al., 2005). Elas são divididas em quatro grupos distintos de acordo com o arranjo dos dois resíduos terminais de cisteína em: CXC, CC, C ou CX<sub>3</sub>C como mostrado na Fig. 6 (MURPHY et al., 2000; HWANG et al., 2004; HWANG et al., 2005).



A família das quimiocinas também tem sido apontada como reguladora da angiogênese (SALCEDO et al., 2000; HWANG et al., 2004). Várias quimiocinas CXC são caracterizadas por apresentarem um domínio composto por três aminoácidos (Glu, Leu, Arg – domínio 'ELR') na porção terminal NH<sub>2</sub>, antes do primeiro resíduo do aminoácido cisteína que confere atividade angiogênica. Assim, as quimiocinas CXC que apresentam o domínio ELR promovem angiogênese (STRIETER et al., 1995; STRIETER et al., 2005).

Estudos demonstram que membros da família das quimiocinas CC como a CCL2, a CCL11, a CCL15 e a CCL23 atuam como moduladores da função endotelial, desempenhando um papel direto sobre a angiogênese (SALCEDO et al., 2000; SALCEDO et al., 2001; HWANG et al., 2004; HWANG et al., 2005; HAN et al., 2009).

**Figura 6 – Classes de quimiocinas.**



Fonte: Townson e Liptak, 2003 (Adaptado).

Os quatro grupos são divididos de acordo com o arranjo dos dois resíduos terminais de cisteína, sendo diferenciados em: CXC, CC, C ou CX<sub>3</sub>C.

### 3.2.2.1 Quimiocina CC-ligante 2 (CCL2)

A quimiocina CC-ligante 2 (CCL2) ou proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) é uma quimiocina pertencente à família das CC quimiocinas, que foi inicialmente identificada como um potente fator quimiotático para monócitos,

macrófagos, linfócitos T de memória e células *natural killer* (NK), contudo estudos têm demonstrado seu papel na remodelação vascular (CHARO; TAUBMAN, 2004; MA et al., 2007).

Sua estrutura molecular encontra-se bem conservada entre humanos, coelhos e camundongos, e tem seus efeitos mediados sobre as células endoteliais através do receptor de quimiocina CC-ligante 2 (CCR2), que se encontra acoplado à proteína G de 7 domínios transmembranosos (SALCEDO et al., 2000). Dependendo do *splicing* alternativo para o CCR2, duas formas do receptor são originadas, o CCR2 A e o CCR2 B, que diferem apenas na sua cauda C-terminal (CHARO et al., 1994; DESHMANE et al., 2009). O CCR2 A é a isoforma expressa principalmente por células mononucleares e células musculares lisas vasculares (VSMC) (BARTOLI et al., 2001), enquanto monócitos e células NK ativadas expressam predominantemente a isoforma CCR2 B (DESHMANE et al., 2009).

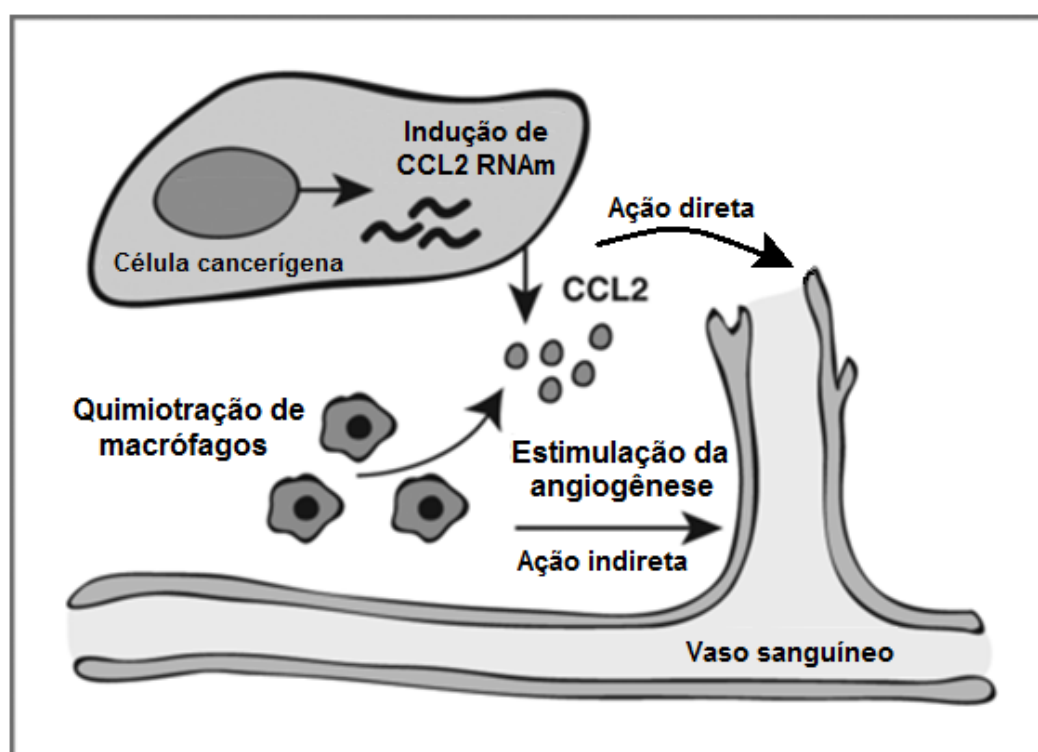
As células VSMC expressam o CCR2 em sua superfície e quando são estimuladas pela CCL2 apresentam a capacidade migratória potencializada (HAYES et al., 1998; WEBER et al., 1999). Além disso, a migração celular estimulada pela CCL2 em HUVEC ainda contribuiu para a reparação de feridas e a ativação inflamatória (WEBER et al., 1999).

O papel de CCL2 na angiogênese foi inicialmente atribuído ao seu efeito quimioatraente sobre monócitos/macrófagos, que por sua vez liberavam fatores angiogênicos (GOEDE et al., 1999). Como demonstrado por Arderiu e colaboradores (2011), o fator tecidual (FT) endógeno foi capaz de regular a produção de CCL2 nas células endoteliais, que por sua vez modulou o efeito angiogênico do FT ao recrutar células do músculo liso e facilitar a maturação dos microvasos recém-formados. Contudo, estudos comprovam que a CCL2 pode exercer efeitos diretos sobre a angiogênese como os observados por Salcedo e colaboradores (2000), que demonstraram que a CCL2 é um mediador direto da angiogênese por sua habilidade em induzir a capacidade migratória de HUVEC, HMEC e a formação de vasos a partir de anéis de aorta. Stamatovic e colaboradores (2006) também demonstraram que a CCL2 estimula a proliferação, a migração e a angiogênese *in vivo* de células endoteliais cerebrais (bEnd.3) na ausência de uma resposta inflamatória. Durante o processo de angiogênese em modelo de anel aórtico, a CCL2 estimulou o recrutamento de células murais o que

sugere que as vias de quimiocinas podem contribuir para a montagem da parede do vaso durante a angiogênese em resposta à injúria (APLIN et al., 2010).

A expressão de CCR2 sobre as células endoteliais demonstra que a CCL2 pode contribuir para a migração, a angiogênese (SALCEDO et al., 2000; STAMATOVIC et al., 2006), o reparo de injúria endotelial, ser regulada durante a ativação inflamatória (WEBER et al., 1999; APLIN et al., 2010), e não apenas mediar a infiltração de monócitos e macrófagos aos locais de inflamação conforme mostrado na Fig. 7.

**Figura 7 – Ação direta/indireta da CCL2 sobre a angiogênese.**



Fonte: Low-Marchelli et al., 2013 (Adaptado).

O papel de CCL2 na angiogênese foi inicialmente atribuído ao seu efeito quimioatratante sobre monócitos/macrófagos durante a resposta inflamatória, que por sua vez liberavam fatores angiogênicos. Contudo, estudos comprovam que a CCL2 pode exercer efeitos diretos sobre a angiogênese.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Reagentes**

Os reagentes utilizados foram: IGF-1, meio de cultura RPMI 1640, solução salina tamponada (PBS), aminoácido L-glutamina não animal, albumina sérica bovina (BSA), fibronectina celular, triton X-100, HEPEs, EGTA, PIPEs, aminoácido glicina, faloidina conjugada a Alexa 488 e sacarose obtidos da Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA), a quimiocina JE/MCP-1 foi obtida de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EUA). O soro bovino fetal estéril (SBF) e tripsina 0.25%-EDTA foram obtidos da Gibco®, Invitrogen (Canadá). O antibiótico ciprofloxacino (Ciprobacter) foi obtido da Isofarma LTDA (Ceará, Brasil) e o meio para montagem rápida de lâminas (Entellan®) da Merck (Alemanha). Os reagentes NaOH, formaldeído e álcool metílico PA foram obtidos de Fmaia (Cotia, SP, Brasil). O  $MgCl_2$  foi obtido de Dinâmica (Diadema, SP), enquanto o corante Giemsa foi obtido de QEEL (São Paulo, SP).

### **4.2 Anticorpos**

Os ensaios de imunocitoquímica foram realizados com o anticorpo primário anti-fibronectina de camundongo produzido em coelho e anticorpo secundário anti-Ig de coelho produzido em cabra conjugado ao isocianato de fluoresceína (GAR-FITC) obtidos da Sigma-Adrich (St. Louis, MO, EUA). Os ensaios de citofluorimetria foram realizados com anticorpos específicos acoplados a fluorocromos: anti-CD49e/ficoeritrina (PE) e anti-CD44/ficoeritrina (PE) produzidos em rato e obtidos da BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA). O isotipo controle IgG2a, controle negativo para os anticorpos conjugados a PE, foi produzido em rato e obtido de eBioscience (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos anti-IGF-IR/complexo proteína clorofila peridina (PerCP), anti-CCR2/isocianato de fluoresceína (FITC), assim como os isotipos controle, controles negativos para os anticorpos PerCP e FITC, foram produzidos em rato e obtidos de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EUA).

### **4.3 Linhagem de células**

Para realização dos ensaios foi utilizada uma linhagem de células endoteliais derivadas de endotelioma de timo de camundongo C57BL/6 (tEnd.1), isoladas e caracterizadas primeiramente por Williams e colaboradores em 1988. Esta linhagem foi obtida do Laboratório de pesquisas sobre o Timo do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).

### **4.4 Padronização da cultura de células**

As células da linhagem tEnd.1 foram cultivadas de acordo com o protocolo experimental desejado, em garrafas de cultura em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e ciprofloxacina 2,5 µl/mL. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A passagem das células, por tratamento com solução de tripsina 0,25%-EDTA 0,02% em solução livre de cálcio e magnésio (CMF) pH 7,2, foi realizada quando estas se encontraram em estado de semi-confluência.

### **4.5 Tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2**

Em todos os ensaios, com exceção dos ensaios funcionais de migração e formação de estruturas semelhantes a capilares, os tratamentos foram realizados em meio RPMI 1640 a 2% de SBF após incubação das culturas em meio RPMI 1640 a 10% de SBF em estufa por 16 horas para a adesão celular. No ensaio de viabilidade celular, para determinar a concentração da quimiocina, as células tEnd.1 foram tratadas nas concentrações (5, 10, 50 e 100 ng/mL) com a CCL2 por 24 horas em meio RPMI 1640 a 2% de SBF. A concentração do IGF-1 foi estabelecida em trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório através do ensaio de proliferação de células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 nas concentrações (5, 10, 50 e 100 ng/mL) por 8 horas. Foi constatado um aumento significativo no número de células tratadas com o IGF-1 na concentração de 100 ng/mL, sendo esta concentração estabelecida para realização dos ensaios. Para avaliar a morfologia das células endoteliais, as culturas foram tratadas por 12, 24 e 48 horas

com o IGF-1 (100 ng/mL) e/ou a CCL2 (10 ng/mL) em meio RPMI 1640 a 2% de SBF. Nos ensaios de expressão de receptores, deposição de MEC, reorganização do citoesqueleto e adesão, as células tEnd.1 foram tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL) e/ou a CCL2 (10 ng/mL) em meio RPMI 1640 a 2% de SBF por 24 horas. No ensaio de migração, o IGF-1 (100 ng/mL) e/ou a CCL2 (10 ng/mL) foram utilizados como fatores quimiotáticos, sendo adicionados em meio RPMI contendo 0,5% de BSA. Para avaliar a formação de estruturas semelhantes a capilares, células tEnd.1 foram tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL) e/ou a CCL2 (10 ng/mL) em meio RPMI 1640 a 10% de SBF por 8 dias, sendo feito no quarto dia um novo tratamento. Neste ensaio, a concentração de SBF foi mantida em 10%, devido o tempo prolongado em que as células foram mantidas em cultura. Em todos os ensaios acima citados, as células tEnd.1 que não receberam tratamento foram utilizadas como grupo controle (CTR).

#### **4.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT**

Em placas de 96 poços foram cultivadas  $1 \times 10^5$  células na presença de meio RPMI 1640 a 10% de SBF. A cultura foi incubada em estufa por 16 horas para a adesão celular. Posteriormente, as células foram tratadas conforme descrito no item 4.5. Após o tratamento, as culturas de células foram incubadas durante 4 horas com 5 mg/mL do sal de tetrazólio (MTT), diluído em RPMI 1640 a 2% de SBF. A redução do MTT por células metabolicamente ativas formou cristais de formazan que foram solubilizados pela adição de DMSO. Por espectrofotômetro (TP-Reader -Thermoplate®) foi feita a leitura da absorbância em 540 nm.

#### **4.7 Ensaio de análise morfológica**

Para a realização deste ensaio,  $5 \times 10^3$  tEnd.1 foram cultivadas na presença de RPMI 1640 a 10% de SBF sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços. A cultura foi incubada por 16 horas para a adesão celular e posteriormente as células receberam o tratamento conforme descrito no item 4.5. Após o tratamento, as culturas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa por 10 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram removidas, montadas em

lâminas permanentes e analisadas por microscopia de luz. As fotos foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i).

#### **4.8 Ensaio de imunocitoquímica**

Em lâminas de vidro do tipo lab-tek foram cultivadas  $1 \times 10^4$  células tEnd.1 na presença de meio RPMI 1640 a 10% de SBF. Após a adesão por 16 horas em estufa, as culturas foram tratadas conforme descrito no item 4.5. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol por 10 minutos. Após a fixação, as culturas foram hidratadas com PBS por 10 minutos e bloqueadas com PBS a 1% de BSA por 30 minutos para impedir a formação de ligações inespecíficas dos anticorpos primários às diferentes preparações. As células endoteliais foram incubadas com o anticorpo primário específico para a fibronectina em câmara úmida por 1 hora e depois lavadas com PBS. Em seguida, as culturas foram incubadas por 45 minutos com o anticorpo secundário GAR-FITC e novamente lavadas com PBS para posterior montagem. As lâminas foram avaliadas através de microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p.

#### **4.9 Ensaio de citometria de fluxo**

As células tEnd.1 foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura na presença de meio RPMI 1640 a 10% de SBF e depois incubadas em estufa por 16 horas para a adesão celular. Após a adesão, as células foram tratadas conforme descrito no item 4.5. Logo após o tratamento, as células foram removidas das garrafas utilizando *cell scraper*, centrifugadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 a 2% de SBF, contadas e depois plaqueadas em placas de 96 poços. Uma suspensão de  $1 \times 10^5$  células foi incubada com anticorpos específicos acoplados a fluorocromos para os seguintes receptores de superfície celular: anti-IGF-1R/PerCP, anti-CCR2/FITC, anti-CD44/PE e a cadeia alfa da integrina VLA-5 (anti-CD49e/PE). Os isotipos controles IgG2a PE, IgG1 PerCP e IgG FITC foram

utilizados como controles negativos. As células tEnd.1 foram incubadas com os anticorpos diluídos em PBS a 2% de SBF por 20 minutos a 4 °C. Após a marcação com os anticorpos, as culturas foram fixadas com formaldeído a 2% e submetidas à análise por citometria de fluxo (Citômetro de fluxo FACS Canto II). A expressão dos receptores e a confecção dos histogramas foi realizada através do software WinMDI versão 2.9.

#### **4.10 Coloração direta do citoesqueleto de F-actina por faloidina-Alexa 488**

As células endoteliais foram cultivadas em garrafas de cultura na presença de meio RPMI 1640 a 10% de SBF e depois incubadas em estufa por 16 horas para a adesão celular. Após a adesão, as células foram tratadas conforme descrito no item 4.5. Para avaliar os microfilamentos do citoesqueleto, em placas de 24 poços foram adicionadas lamínulas redondas (13 mm de diâmetro) que foram revestidas com fibronectina (10 µg/mL) e mantidas à temperatura ambiente por 1 hora para polimerização da glicoproteína. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio completo e uma suspensão de  $2 \times 10^3$  células foi adicionada na placa de 24 poços previamente revestida ou não com a fibronectina e foram incubadas em estufa para a adesão por 16 horas. Logo após a adesão, as células foram fixadas e permeabilizadas com a solução PHEM (tampão de Pipes, HEPES, EGTA e  $MgCl_2$ ) a 5% de sacarose, 4% de paraformaldeído e 0,5% de triton X-100 por 5 minutos. As culturas de células depois foram novamente fixadas com a solução PHEM a 4% de paraformaldeído por 20 minutos. Após fixação, as culturas foram lavadas com a solução PHEM + glicina e marcadas para F-actina pela coloração direta com faloidina-Alexa 488 diluída em solução PHEM + glicina por 30 minutos. As culturas foram novamente lavadas com PHEM + glicina, seguida da remoção das lamínulas que foram montadas em lâminas permanentes e analisadas por microscopia confocal de fluorescência.

#### **4.11 Ensaio de adesão celular**



Em placas de 6 poços foram adicionadas  $1 \times 10^5$  células tEnd.1 em meio RPMI 1640 a 10% de SBF e incubadas em estufa por 16 horas para a adesão celular. Posteriormente, as células foram tratadas como descrito no item 4.5. Inicialmente, as placas de 96 poços foram revestidas com a fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e mantidas à temperatura ambiente por 1 hora para polimerização da glicoproteína. Em seguida, os poços da placa foram lavados com PBS e a placa foi mantida em temperatura ambiente até secagem completa dos poços. Posteriormente, os poços foram bloqueados com solução de PBS a 0,1% de BSA por 45 minutos em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio completo e uma suspensão de  $5 \times 10^4$  células foi adicionada na placa de 96 poços previamente revestida ou não com a fibronectina. Posteriormente, os poços foram bloqueados com PBS a 0,1% de BSA e em seguida, a adesão das células tEnd.1 à matriz de fibronectina foi permitida por um período de 1 hora. Após o período de adesão, a remoção das células não aderentes foi realizada através de duas lavagens sucessivas dos poços com RPMI à 37 °C. As células aderentes foram fixadas com PBS a 4% de formaldeído por 10 minutos e depois coradas com cristal violeta em 2% de metanol. O excesso de corante foi removido por imersão das placas em recipiente contendo água destilada. Após secagem completa dos poços da placa, o corante foi solubilizado com água destilada a 1% de SDS por 30 minutos. Por espectrofotômetro (TP-Reader-Thermoplate®) foi feita a leitura da absorbância em 540 nm.

#### **4.12 Ensaio de migração endotelial em câmara de *transwell***

A migração das células tEnd.1 foi avaliada utilizando o sistema de *transwell*, que consiste de insertos com membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8,0  $\mu\text{m}$  (Corning Costar, Cambridge, USA). Inicialmente, as membranas foram revestidas com a fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e mantidas à temperatura ambiente por 1 hora para polimerização da glicoproteína. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS e depois bloqueadas com solução de PBS a 0,1% de BSA por 45 minutos em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o bloqueio, os insertos foram adicionados sobre placa de 24 poços contendo RPMI 1640 a 0,5% de BSA contendo o IGF-1 (100 ng/mL) e/ou a CCL2 (10 ng/mL) que foram

utilizados como fatores quimiotáticos. Uma suspensão de  $2 \times 10^5$  tEnd.1 foi adicionada na parte superior da membrana em meio RPMI 1640 a 0,5% de BSA. Após 6 horas de migração em estufa, as células não migrantes foram raspadas da face superior da membrana e as que migraram para a parte inferior foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa por 10 minutos. A contagem de células migrantes foi realizada segundo metodologia descrita por Leavesley e colaboradores (1992).

#### **4.13 Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares**

A habilidade das células tEnd.1 em formar estruturas semelhantes a capilares foi avaliada na presença ou não de fibronectina. O revestimento de fibronectina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foi preparado sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços e mantido à temperatura ambiente por 1 hora para polimerização da glicoproteína. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e depois bloqueadas com solução de PBS a 0,1% de BSA por 45 minutos em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o bloqueio, uma suspensão de  $4 \times 10^4$  células em 1 mL de meio RPMI 1640 a 10% de SBF foi adicionada sobre as lamínulas e tratada como descrito no item 4.5. Por 8 dias as culturas foram incubadas em estufa, sendo no quarto dia realizado a troca do meio e um novo tratamento. No oitavo dia, a cultura foi fixada com metanol e corada com Giemsa por 10 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e montadas em lâminas permanentes e analisadas por microscopia de luz. As fotos foram obtidas pela câmara Nikon modelo DS-Ri1 campo claro (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A área luminal e a formação de estruturas semelhantes a capilares foram mensuradas através do programa DP2–BSW Versão: Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

#### **4.14 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA ou Two-way ANOVA seguidos do pós-teste Bonferroni. Os valores foram representados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

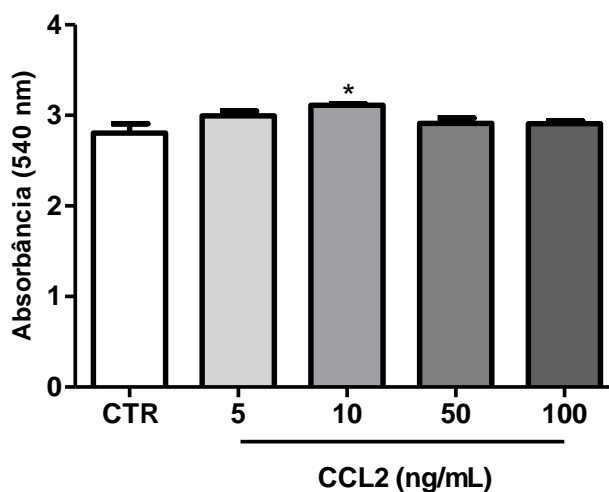
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da CCL2 sobre a viabilidade de células endoteliais.

A viabilidade das células endoteliais na presença de diferentes concentrações da quimiocina CCL2 (5, 10, 50 ou 100 ng/mL), após 24 horas de tratamento foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT.

Através deste ensaio foi observado que a quimiocina CCL2, na concentração de 10 ng/mL foi capaz de estimular de forma significativa a viabilidade das células endoteliais e nas demais concentrações manteve a viabilidade celular quando comparado ao controle (Fig. 8). Considerando que a CCL2 na concentração de 10 ng/mL estimulou significativamente a viabilidade das células tEnd.1, esta concentração foi utilizada nos ensaios posteriores.

**Figura 8 - Efeitos da CCL2 na viabilidade das células tEnd.1.**



Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais foram tratadas com a CCL2 nas concentrações de 5, 10, 50 ou 100 ng/mL e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT. As barras representam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ). (\*) Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle,  $*p < 0,05$ . One-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

## 5.2 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a morfologia de células endoteliais.

O ensaio de análise morfológica foi realizado após 12, 24 e 48 horas de cultivo para identificar em qual período de tratamento as células endoteliais são estimuladas a desenvolver alterações na morfologia relacionadas à função endotelial.

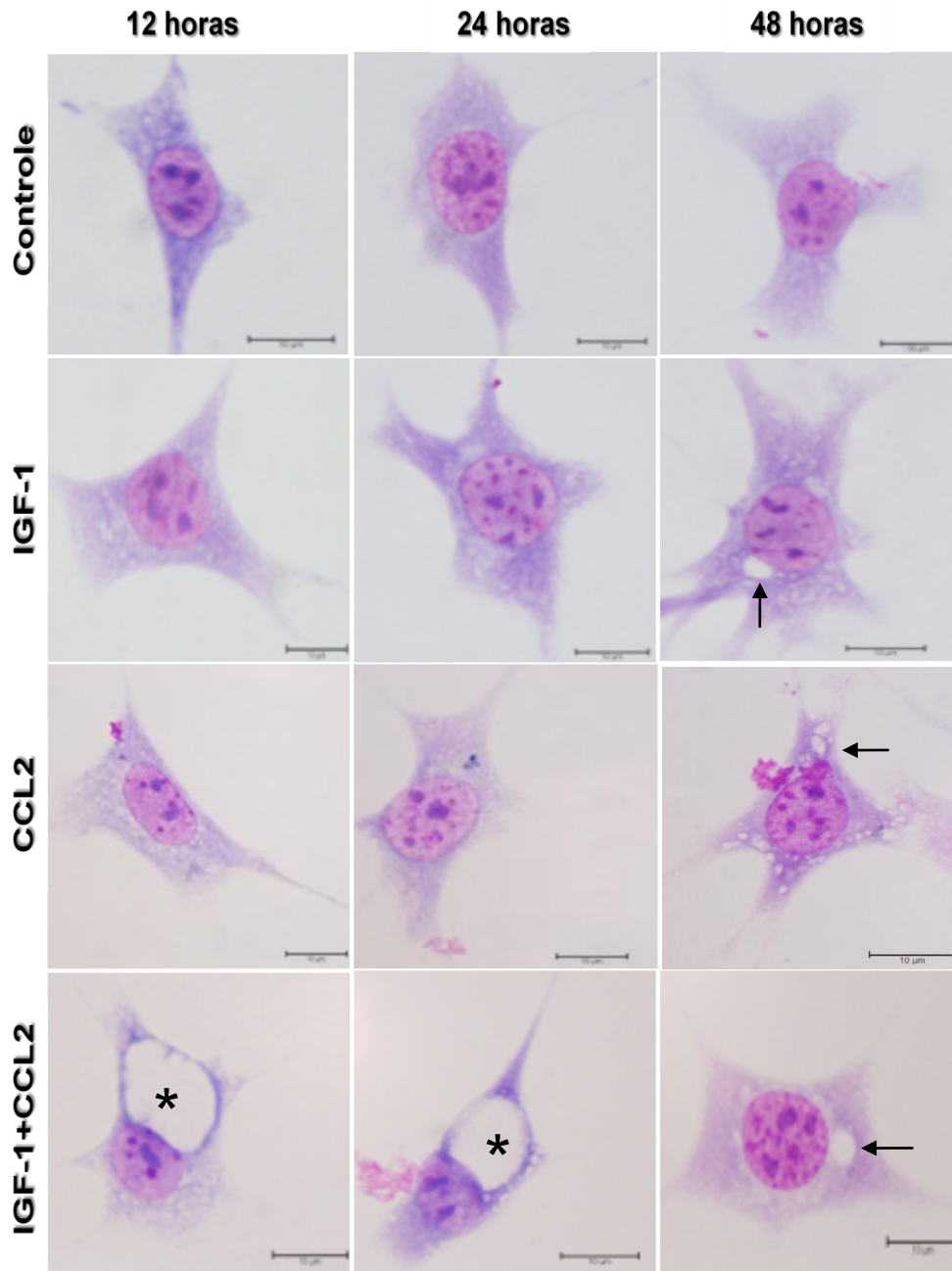
As células tEnd.1 cultivadas sem adição de tratamento por um período de 12, 24 e 48 horas exibiram uma forma alongada com abundante citoplasma e longos prolongamentos. O núcleo geralmente centralizado apresentava uma forma arredondada ou elíptica conforme mostrado na Fig. 9.

As células expostas ao tratamento com o IGF-1 ou a CCL2, nos períodos de 12 e 24 horas, não demonstraram alterações morfológicas evidentes quando comparadas com as células endoteliais do grupo controle. Entretanto, as células mostraram-se vacuoladas após 48 horas de tratamento (Fig. 9).

Modulações acentuadas foram observadas na morfologia das células endoteliais, quando cultivadas com o tratamento combinado de IGF-1/CCL2 durante 12 e 24 horas, como demonstrado pela formação de lumens intracelulares que são estruturas mais complexas que os vacúolos intracelulares. No período de 48 horas de tratamento apenas a formação de vacúolos intracelulares foi identificada nas células endoteliais, indicando a diminuição do efeito da quimiocina e do fator de crescimento após este período (Fig. 9).

A exposição das células tEnd.1 ao tratamento com a associação IGF-1/CCL2, por 12 e 24 horas estimulou maiores alterações na morfologia endotelial. Desta forma, o período de tratamento por 24 horas foi o escolhido para a realização dos ensaios subsequentes.

Figura 9 - Morfologia das células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2.



Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 por 12, 24 e 48 horas. Seta indica vacúolo intracelular. Asterisco indica lúmen intracelular. Coloração pelo Giemsa (1000x). Barras representam 10  $\mu$ m.

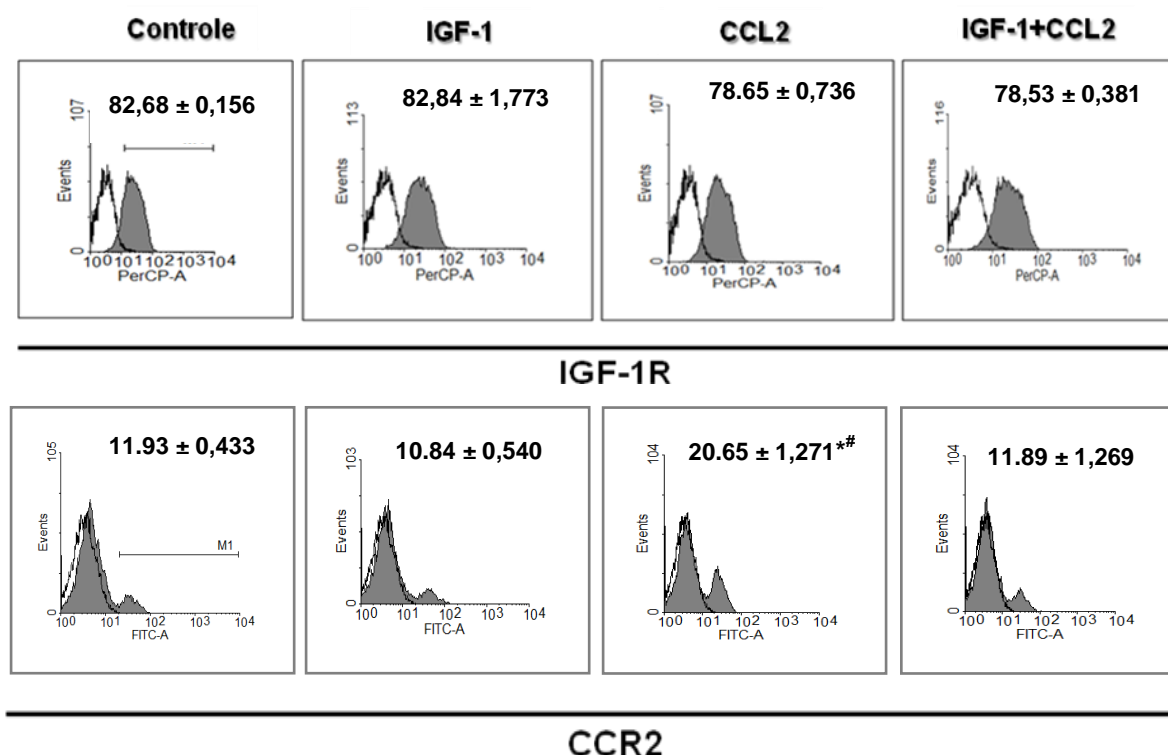
### **5.3 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a expressão de seus receptores em células endoteliais.**

O IGF-1 e a CCL2 influenciam as propriedades biológicas desempenhadas pelas células endoteliais via receptores IGF-1R e CCR2, respectivamente. Como forma de avaliar a expressão destes receptores nas células tEnd.1 foi realizada a análise citofluorimétrica.

As células endoteliais expressaram em sua superfície tanto o IGF-1R como o CCR2, sendo o primeiro mais abundantemente expresso que o segundo. No grupo controle,  $82\% \pm 0,156$  das células endoteliais expressaram em sua superfície o IGF-1R e  $11\% \pm 0,433$  expressaram o CCR2 conforme mostrado na Fig. 10.

Os tratamentos não interferiram no percentual de células que expressaram o IGF-1R quando comparados às células do grupo controle. Entretanto, a adição da quimiocina promoveu um aumento significativo de 73% do percentual de células que expressaram o CCR2. Por outro lado, o tratamento com o IGF-1 ou a associação IGF-1/CCL2 não promoveram alterações na expressão deste receptor (Fig. 10).

**Figura 10 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na expressão de seus receptores por células tEnd.1.**



Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais foram tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram representados na forma de histogramas com o número percentual médio de células que expressaram o receptor IGF-1R ou CCR2 (preto cheio) e do controle Ig (preto vazado). Os valores estão expressos como a média ± EPM (n=4 por grupo). (\*\*\*) Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, \*\*\*p < 0,0001 e (#) estatisticamente significativo em relação aos demais tratamentos, #p < 0,0001. One-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

#### **5.4 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a deposição de fibronectina por células endoteliais.**

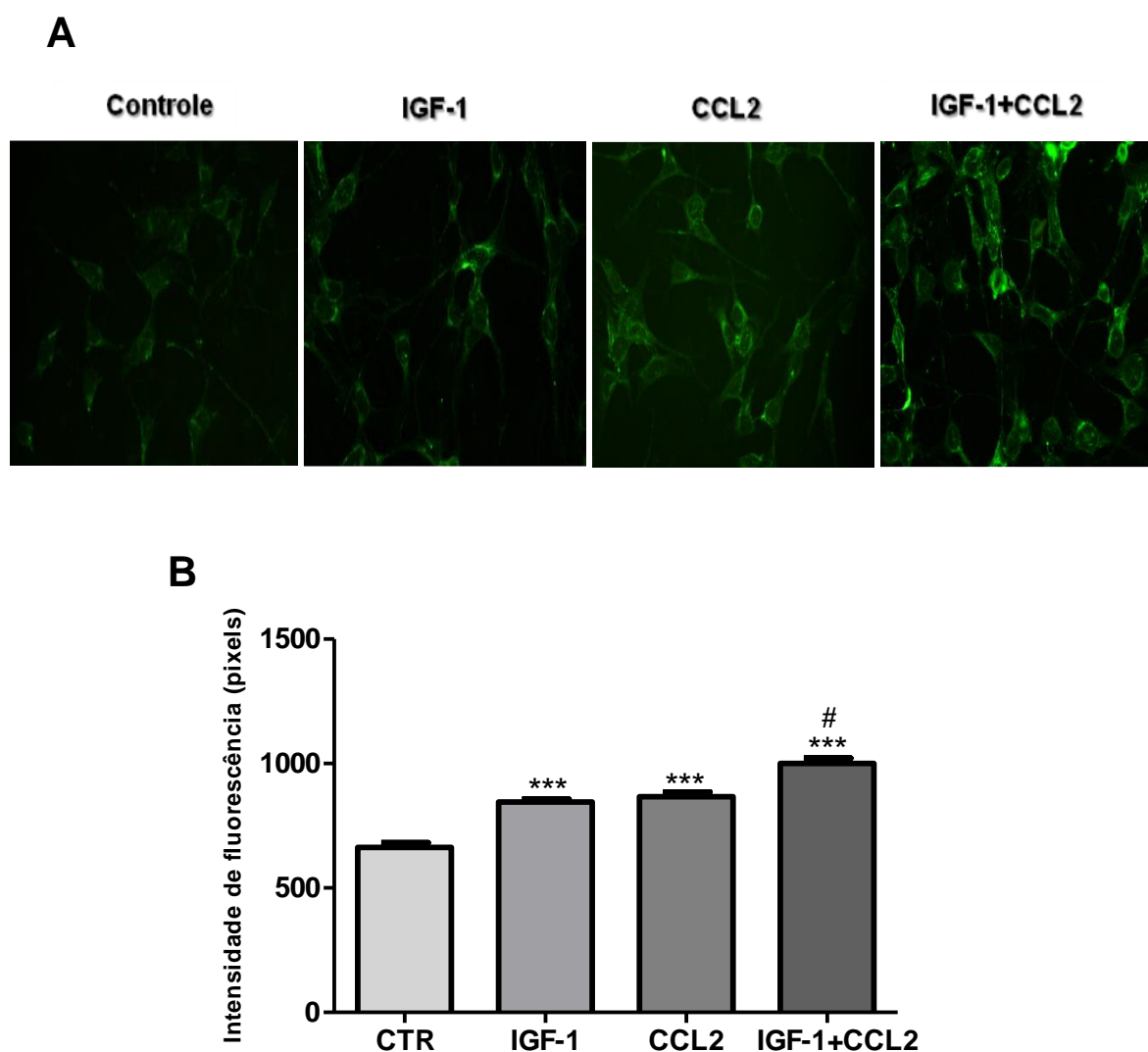
Vários componentes da matriz extracelular estão diretamente envolvidos na fisiologia das células endoteliais e agem sobre a função endotelial de forma conjunta com as citocinas presentes na matriz.

Para avaliar o efeito do tratamento das células endoteliais com as citocinas IGF-1 e/ou CCL2 na deposição de matriz extracelular, foi utilizado o método imunocitoquímico com anticorpo específico para a fibronectina. Foi constatado pela análise qualitativa um aumento na deposição de fibronectina quando as células tEnd.1 foram tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2 conforme mostrado na Fig. 11 A.

A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que os tratamentos estimularam de forma significativa a deposição de fibronectina quando comparado ao grupo controle e ainda demonstrou que a deposição de fibronectina na presença da associação IGF-1/CCL2 mostrou-se significativamente maior quando comparada aos tratamentos isolados (Fig. 11 B).



Figura 11 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na deposição de fibronectina por células endoteliais tímica.



Fonte: Autora, 2013.

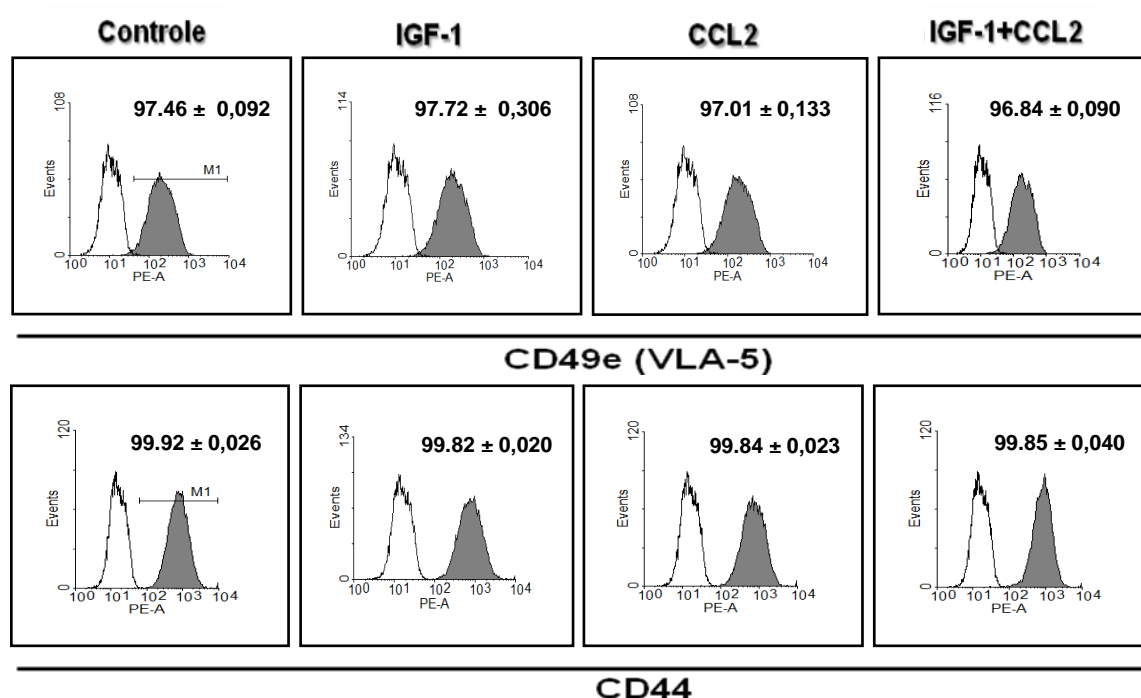
As células endoteliais tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas foram avaliadas por microscopia de fluorescência. (A) Fotomicrografias mostram a deposição de fibronectina. (B) Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. Barras representam a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência (n=4 por grupo). (\*\*\*) Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle,  $***p < 0,0001$  e (#) estatisticamente significativo em relação aos demais tratamentos,  $\#p < 0,0001$ . One-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

## 5.5 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a expressão de receptores para fibronectina em células endoteliais.

A interação da MEC com as células endoteliais ocorre por meio da ligação de receptores da superfície celular com os ligantes da matriz. Assim, despertou-se o interesse em avaliar a expressão de receptores para a fibronectina, tais como o CD49e (cadeia alfa da integrina  $\alpha 5\beta 1/VLA5$ ) e o CD44 (proteoglicano transmembranar), na superfície das células por citometria de fluxo.

Foi constatado que um alto percentual de células endoteliais expressaram em sua superfície as moléculas CD49e ( $97\% \pm 0,092$ ) e CD44 ( $99\% \pm 0,026$ ) conforme mostrado na Fig. 12. Adicionalmente, a expressão das moléculas CD49e e CD44 nas células endoteliais não foi alterada pelo tratamento com o IGF-1 e/ou CCL2 quando comparado ao grupo controle (Fig. 12).

**Figura 12 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na expressão de receptores para fibronectina em células tEnd.1.**



Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram representados na forma de histogramas com o número percentual médio de células que expressaram os receptores para a fibronectina CD49e e CD44 (preto cheio) e do controle Ig (preto vazado) de um experimento representativo. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  EPM ( $n = 4$  por grupo). One-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

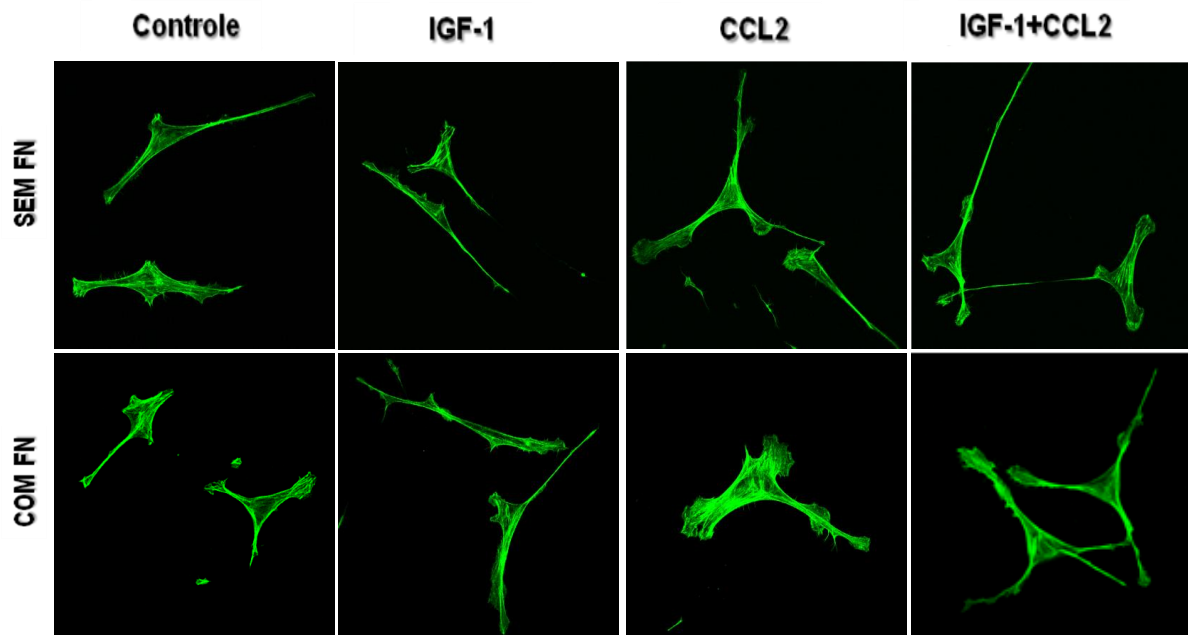
## **5.6 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre o citoesqueleto em células endoteliais.**

O citoesqueleto de actina se conecta com as integrinas da membrana celular e desta forma agem como mediadores dos sinais extracelulares para o interior da célula. Para avaliar o efeito do IGF-1 e/ou CCL2 sobre a organização do citoesqueleto na presença de uma matriz de fibronectina foi realizada a marcação direta da F-actina por faloidina.

Foi constatado que as células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 mostraram o citoesqueleto de F-actina mais alongado, evidenciando pouca formação de lamelipódios e fibras de estresse e quando as células foram cultivadas sobre a matriz de fibronectina mantiveram estas características, porém o citoesqueleto mostrou-se mais alongado (Fig. 13). O tratamento com a CCL2 estimulou mudanças mais marcantes na reorganização do citoesqueleto das células endoteliais, promovendo a formação de lamelipódios e filopódios e quando as células foram cultivadas em matriz de fibronectina mostraram estas características mais pronunciadas, além de evidenciarem um aumento nas fibras de estresse (Figura13).

A organização do citoesqueleto de F-actina das células tEnd.1 tratadas com a associação IGF-1/CCL2 mostrou características intermediárias aos tratamentos com o IGF-1 ou com a CCL2 apenas. As células mostraram-se alongadas com formação de lamelipódios e evidenciaram mais fibras de estresse quando comparado ao controle. Na presença de fibronectina, as células formaram mais fibras de estresse, mantiveram os lameliódios, mas apresentaram menor alongamento (Figura 13).

**Figura 13 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 no citoesqueleto de F-actina em células endoteliais tímicas.**



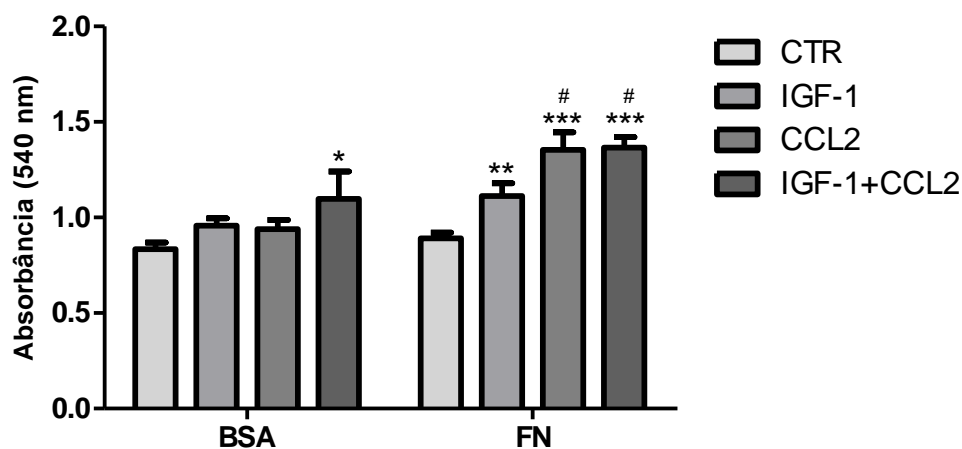
Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas foram coradas com faloidina-Alex a 488 e analisadas por imunofluorescência (1000x).

### 5.7 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na adesão célula-matriz extracelular.

A capacidade de adesão das células endoteliais frente a uma matriz de fibronectina foi avaliada por espectrofotometria após serem estimuladas com o IGF-1 e/ou a CCL2. Assim, foi possível verificar que a adesão das células endoteliais à superfície revestida por BSA (proteína não relacionada à adesão) foi estimulada apenas quando exposta ao tratamento combinado de IGF-1/CCL2 (Fig. 14). Contudo, na presença de fibronectina todos os tratamentos estimularam de forma significativa um aumento na adesão das células endoteliais. Adicionalmente, o tratamento com a CCL2 ou a associação IGF-1/CCL2 foram capazes de estimular de forma significativa um aumento na adesão quando comparado ao tratamento apenas com o IGF-1 conforme mostrado na Fig. 14.

Figura 14 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na adesão célula-matriz extracelular.



Fonte: Autora, 2013.

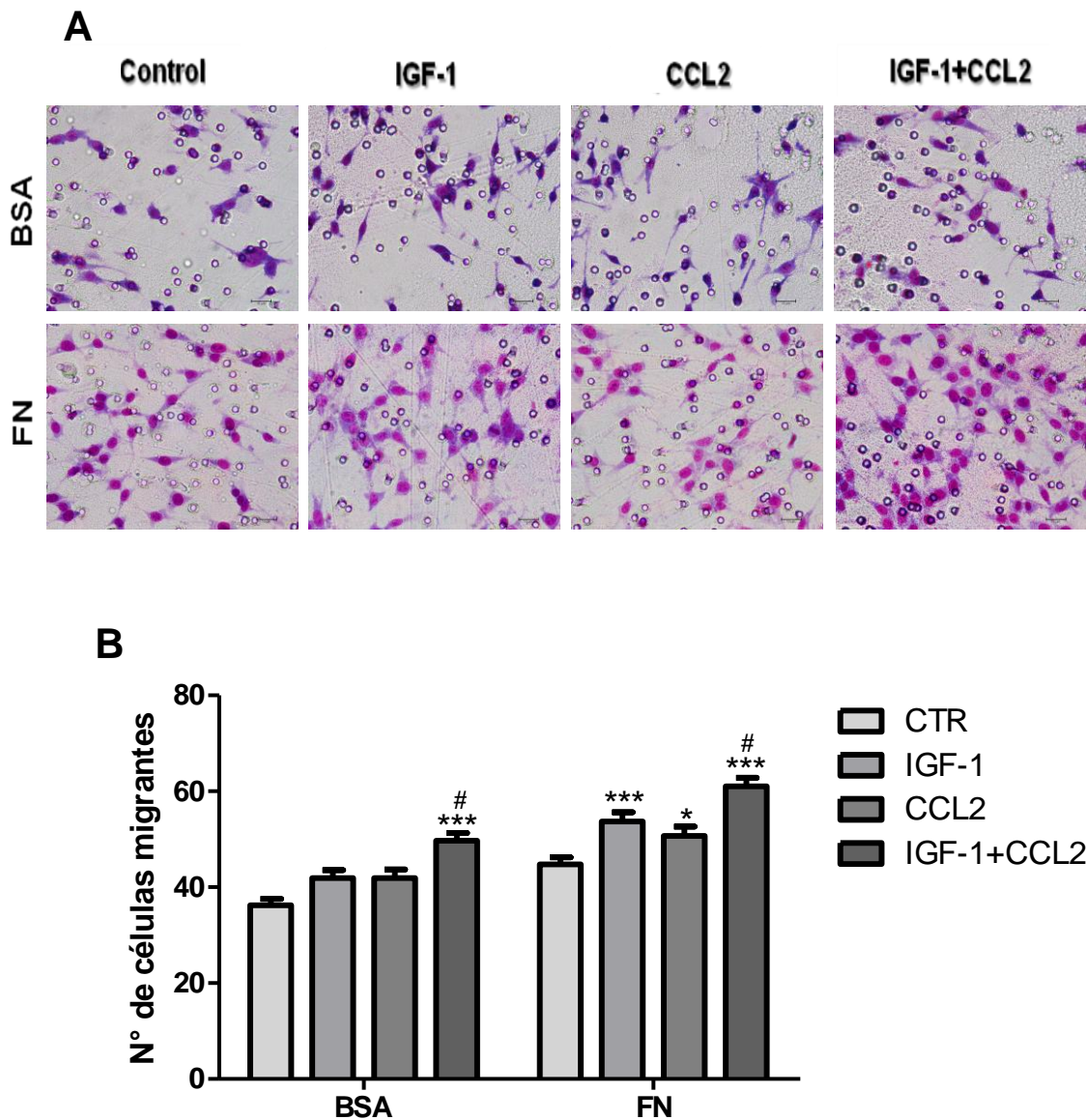
As células endoteliais tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 durante 24 horas foram permitidas aderir por 1 hora sobre o revestimento de fibronectina ou BSA. A adesão foi avaliada por espectrofotometria. Barras representam a média  $\pm$  EPM da absorbância (n=4 por grupo). (\*), (\*\*), (\*\*\*) Valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e (#) valor estatisticamente significativo em relação aos demais tratamentos # $p < 0,05$ . Two-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

## 5.8 Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 sobre a migração de células endoteliais.

Com o intuito de avaliar a influência do IGF-1 e/ou da CCL2 em induzir a quimiotaxia em células endoteliais, estas foram permitidas migrar através de câmaras de *transwell* revestidas com fibronectina ou BSA. O efeito de CCL2 e IGF-1 na migração das células tEnd.1 foi analisado pela contagem das células migrantes aderidas a face inferior da membrana do *transwell* conforme mostrado na Fig. 15 A.

A migração frente ao BSA foi significativa apenas quando as células receberam o estímulo quimiotático da associação IGF-1/CCL2, sendo esta resposta quimiotática significativamente maior quando comparada aos tratamentos isolados (Fig. 15 B). Na presença de fibronectina, as células endoteliais apresentaram uma resposta quimiotática significativa após estímulo com todos os tratamentos quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, as células estimuladas com a associação IGF-1/CCL2 demonstraram um pico de migração que se mostrou estatisticamente significativo em relação ao grupo controle e aos tratamentos isolados (Fig. 15 B).

**Figura 15 - Efeitos de IGF-1 e/ou CCL2 na migração de células tEnd.1 através da membrana do *transwell*.**



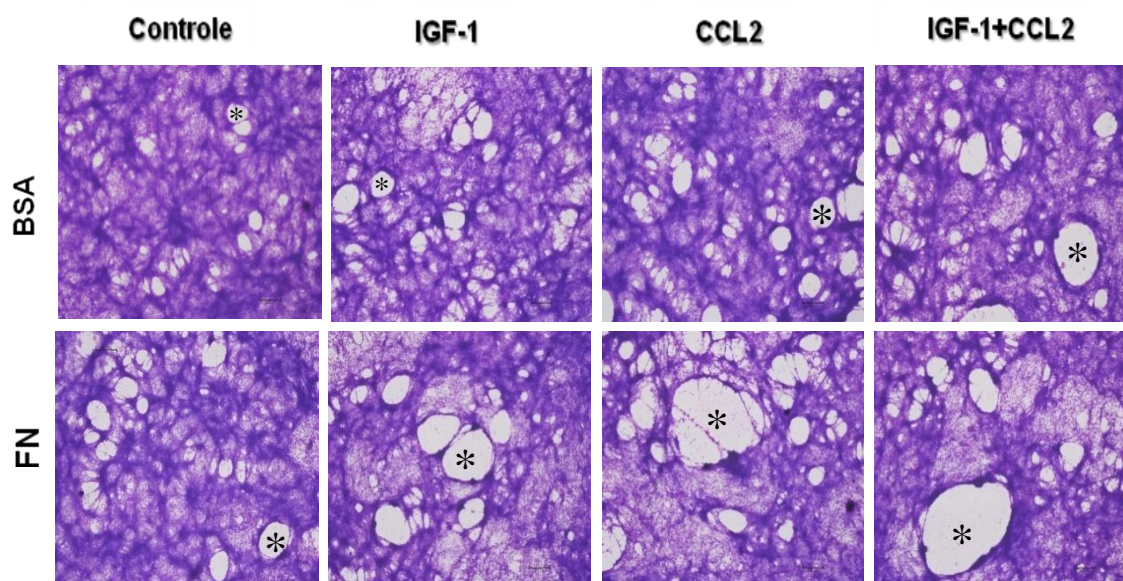
Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais foram permitidas migrar através das membranas de *transwell* sob o estímulo quimiotático de IGF-1 (100 ng/mL), CCL2 (10 ng/mL) ou IGF-1/CCL2 por 6 horas frente a revestimento de fibronectina ou BSA. **(A)** As fotomicrografias representam células aderidas à face inferior da membrana. Coloração pela Giemsa (400x). **(B)** Barras representam a média  $\pm$  EPM do número de células migrantes (n=4 por grupo). (\*), (\*\*\*) Valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 e (#) valor estatisticamente significativo em relação aos demais tratamentos, #p < 0,01. Two-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

### 5.9 Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.

Nos ensaios de análise morfológica das células endoteliais foi observado que o tratamento combinado com o IGF-1/CCL2 por 12 e 24 horas, promoveu a formação de lumens intracelulares na ausência de matriz extracelular. Mantendo o cultivo das células por um período mais longo e sobre um revestimento de fibronectina foi observado que após 8 dias de cultura, estas mesmas células apresentaram a habilidade de formar estruturas mais complexas, semelhantes a capilares sobre revestimento ou não de fibronectina conforme mostrado na Fig. 16.

**Figura 16 - Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais tímicas.**



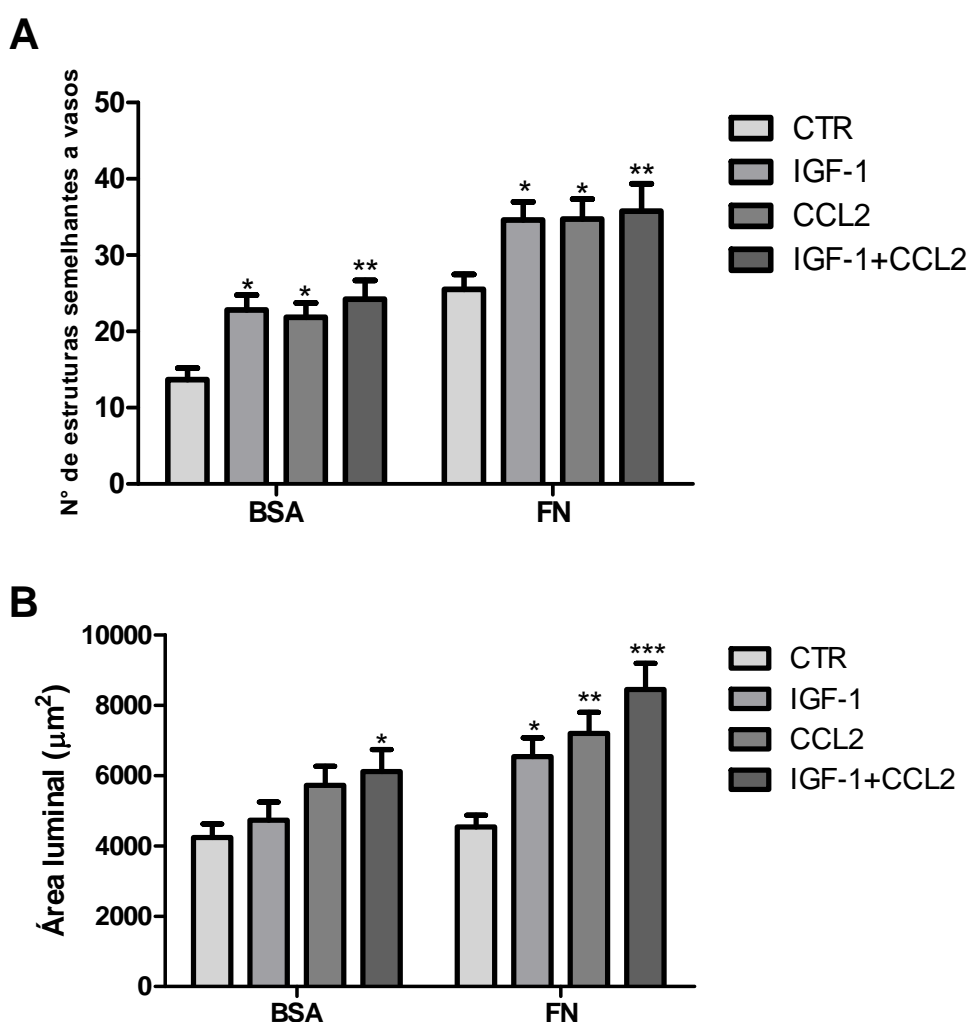
Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais foram tratadas com o IGF-1 (100 ng/mL), a CCL2 (10 ng/mL) ou o IGF-1/CCL2 na presença de fibronectina ou BSA durante 8 dias e posteriormente analisadas por microscopia óptica. Fotomicrografias mostram a formação de estruturas semelhantes a capilares, indicada pelos asteriscos. Coloração pela Giemsa (40x).



O número de estruturas semelhantes a capilares (ESC) formadas na presença ou não de fibronectina foi estatisticamente maior quando as células tEnd.1 foram tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2 em relação ao grupo controle (Fig. 17 A). Quando a área do lúmen das células endoteliais foi mensurada, foi constatado que apenas as culturas de células tratadas com a associação IGF-1/CCL2 na presença de BSA apresentaram um aumento na área do lúmen quando comparado ao controle. Na presença de FN, todos os tratamentos estimularam um aumento na área luminal quando comparado ao grupo controle (Fig. 17 B).

**Figura 17 - Ação de IGF-1 e/ou CCL2 na formação de estruturas semelhantes a capilares e área do lúmen sobre revestimento de fibronectina.**



Fonte: Autora, 2013.

As células endoteliais formaram ESC após 8 dias de cultura sob tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2 por 8 dias. (A) Mostra o número de estruturas semelhantes a vasos e em (B) a área luminal destas estruturas. Barras representam média  $\pm$  EPM. (\*), (\*\*), (\*\*\*) Valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Two-way Anova seguido do pós-teste Bonferroni.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou um sinergismo causado pela associação do IGF-1 com a quimiocina CCL2 em presença da matriz de FN sobre as células endoteliais, como foi demonstrado pela maior capacidade migratória e formação de lumens extracelulares com área média maior. A importância da FN para as células endoteliais foi confirmada pelo aumento na deposição de FN após os tratamentos com as citocinas. Além disso, o rearranjo intermediário do citoesqueleto de F-actina promovido pela associação das citocinas contribuiu para estimular a adesão e migração endotelial.

A interação entre as células e os componentes extracelulares é indispensável na determinação do comportamento celular (DIVYA et al., 2007). Em condições fisiológicas, a MEC é uma reserva de vários fatores de crescimento em estado de latência. Com a injúria e a degradação da MEC, os fatores de crescimento anteriormente vinculados e inativos são liberados em formas ativas que contribuem para o reparo e a cicatrização de ferida (DIVYA et al., 2007).

Como forma de mimetizar e compreender as interações entre os fatores angiogênicos e a MEC envolvidos na migração de células endoteliais, foi avaliada em nosso estudo a ação de IGF-1 e/ou CCL2 sobre as células tEnd.1 cultivadas em uma matriz rica em fibronectina. Para isso, primeiramente foi determinada a concentração do fator de crescimento e da quimiocina capaz de estimular a fisiologia das células endoteliais tímicas.

A concentração do IGF-1 foi estabelecida em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, em que foi observado um aumento da proliferação das células tEnd.1 quando foram estimuladas pelo fator de crescimento na concentração de 100 ng/mL. Ainda, dados da literatura mostraram que o IGF-1, nesta mesma concentração foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade das células endoteliais progenitoras e estimular a formação de unidades formadoras de colônias (THUM et al., 2007).

Neste estudo, a quimiocina CCL2 na concentração de 10 ng/mL foi capaz de estimular a viabilidade das células endoteliais quando comparado ao controle. De forma semelhante, Stamatovic e colaboradores (2006) demonstraram que células bEnd.3 após estímulo com a CCL2 apresentaram maior capacidade

proliferativa em relação ao controle. No entanto, em HUVEC não foi observada alteração na proliferação em relação ao grupo controle (WEBER et al., 1999). Diferenças nestes resultados podem ser observadas devido a distinta origem embrionária ou exposição das HUVEC em relação ao cultivo e a forma de armazenamento (YU et al., 2002).

A concentração da quimiocina CCL2 estabelecida para o estudo foi 10 ng/mL, não apenas pelo seu efeito significativo no aumento da viabilidade celular, mas também porque estudos anteriores mostraram que esta concentração estimulou a máxima incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina e a migração de células musculares lisas de artéria pulmonar (SANCHEZ et al., 2007), e ainda, esta mesma concentração foi determinada como a ED50 (a dose que produziu o efeito desejado em 50% da população) para a quimiotração de linfócitos (BROWN et al., 2007).

A ação de IGF-1 e CCL2 é mediada por seus receptores IGF-1R e CCR2, respectivamente. Assim, por citometria de fluxo foi avaliada a expressão destes receptores de superfície celular e constatou-se que as células tEnd.1 expressaram ambos os receptores, sendo o primeiro mais abundantemente expresso que o segundo. A baixa expressão de CCR2 em células endoteliais também foi observada por Stamatovic e colaboradores (2006) em células bEnd.3, mas isto não impediu a funcionalidade deste receptor. Segundo Fantuzzi e colaboradores (1999), a baixa expressão deste receptor *in vitro* em células quiescentes é crítica para a resposta de macrófagos diferenciados, pois resulta na baixa responsividade à CCL2, o que fornece um sistema regulador eficiente para controlar o grau de recrutamento e ativação de macrófagos.

A expressão de IGF-1R e CCR2 foi observada em diferentes tipos de células endoteliais. A expressão do RNAm e do receptor de IGF-1R, como também sua fosforilação foram demonstradas em HUVEC (NITERT et al., 2005). Nestas mesmas células foi comprovada a expressão do receptor CCR2 (SALCEDO et al., 2000; WEBER et al., 1999) e de seu RNAm (WEBER et al., 1999) e ainda, em HMEC foi demonstrada a expressão deste mesmo receptor (SALCEDO et al., 2000).

A expressão do IGF-1R na superfície das células tEnd.1 não foi alterada pelo tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2, contudo a expressão do CCR2 foi significativamente aumentada após o tratamento com a quimiocina, semelhante ao

constatado por Stamatovic e colaboradores (2006), em que o tratamento de células bEnd.3 com a CCL2 induziu um aumento significativo na expressão de RNAm de CCR2. Contudo, o efeito positivo da CCL2 sobre a expressão do seu receptor, o CCR2, não foi mantido quando combinado com o IGF-1.

Segundo Dalle e colaboradores (2001) os receptores tirosina quinase como o IGF-1R e o IR interagem com as proteínas G, apresentando estreita dependência de seus componentes de sinalização. Desta forma, componentes da sinalização da proteína G como as quinases de receptores acoplados à proteína G (GRK) são recrutadas pelo IGF-1R que apresenta a fosforilação dos seus resíduos de serina dependentes destas GRK (ZHENG et al., 2012). Assim, a diminuição da expressão do CCR2 próximo aos níveis basais, após o tratamento combinado com o IGF-1/CCL2 pode ser justificada pelo recrutamento dos componentes de sinalização da proteína G pelo IGF-1R que foi mais abundantemente expresso nas células endoteliais que o CCR2, um receptor acoplado à proteína G.

Apesar do tratamento de forma única ou combinada do IGF-1 com a CCL2 não ter modulado a expressão do IGF-1R, assim como o tratamento com o IGF-1 associado a CCL2 ter levado a diminuição da expressão do CCR2 estimulada pela CCL2 próximo aos níveis basais, a funcionalidade destes receptores foi confirmada pela ação destas citocinas, via receptores, de estimularem a fisiologia das células endoteliais. Esta modulação foi observada através da produção de MEC, reorganização do citoesqueleto, capacidade de adesão, migração e formação de estruturas semelhantes a capilares. Contudo, sugere-se a avaliação da fosforilação dos receptores IGF-1R e CCR2 como forma de compreender melhor os mecanismos intracelulares envolvidos no estado de ativação desses receptores modulado pelos seus ligantes IGF-1 ou CCL2 respectivamente.

As propriedades biológicas desempenhadas pelas células endoteliais não são reguladas apenas por citocinas, mas em conjunto com os componentes da matriz extracelular que atuam de forma reguladora na função endotelial (SCHNAPER et al., 1993). Assim, a avaliação da deposição da fibronectina, uma glicoproteína da MEC, demonstrou o efeito das citocinas IGF-1 e/ou CCL2 em modular a produção de matriz.

Em células endoteliais, a fibronectina é uma glicoproteína que atua na fixação, aderência (JAFFE; MOSHER, 1978) e migração durante a angiogênese

(VERNON; SAGE, 1995; SENGER, 1996) e juntamente com o colágeno intersticial ativa as células endoteliais e estimula a morfogênese tubular (SENGER, 1996; DAVIS et al., 2002; LIU; SENGER, 2004; DAVIS; SENGER, 2005).

A marcação específica para fibronectina mostrou que os tratamentos com o IGF-1 e/ou a CCL2 estimularam de forma significativa a deposição da glicoproteína em relação ao controle, demonstrando sua importância para a função endotelial. Semelhante ao observado em nossos resultados, Stamatovic e colaboradores (2006) demonstraram que as células bEnd.3 estimuladas com a CCL2 aumentaram a expressão do RNAm para esta glicoproteína. Em células musculares lisas de aorta torácica murina (SMC) e células epiteliais de túbulo proximal, o tratamento com IGF-I também promoveu a produção de fibronectina (LO, 1999; NEW et al., 2012), contudo, em células epiteliais da córnea humana (HCEC) o estímulo com o IGF-1 não alterou a produção da glicoproteína quando comparado ao controle (LEE et al., 2006).

Segundo Tamaroglio e Lo (1994), a expressão de fibronectina apresentou-se distinta após o tratamento com o IGF-1, dependendo do tipo celular. Enquanto em culturas de células mesangiais glomerulares a deposição de fibronectina foi observada apenas na superfície celular, em células SMC houve um aumento na expressão de RNAm da glicoproteína e acúmulo somente no sobrenadante. Esta diferença pode ser justificada pela expressão de receptores de FN na superfície celular, sugerindo que em células mesangiais há mais FN ligada aos receptores que em SMC.

A interação entre a célula e a fibronectina da matriz extracelular promove a ativação celular por meio de interações com os receptores de superfície, usualmente através da integrina  $\alpha 5\beta 1$  (WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003). Enquanto a integrina  $\alpha 5\beta 1$ , reconhece primariamente um único ligante que é a fibronectina (AVRAAMIDES et al., 2008), outras moléculas como o proteoglicano CD44 pode ligar-se a fibronectina (JALKANEN; JALKANEN, 1992; FUJIMOTO et al., 2001), como também ao ácido hialurônico (ARUFFO et al., 1990; AHRENS et al., 2001; FUJIMOTO et al., 2001) e o colágeno (GALLATIN et al., 1989; FUJIMOTO et al., 2001).

As integrinas são receptores transmembranares com domínios citoplasmáticos que estão associados a proteínas adaptadoras que ligam as

integrinas ao citoesqueleto, quinases citoplasmáticas e receptores de fatores de crescimento (QIN; ZHANG, 2010). Elas podem mediar a mobilidade e propriedades adesivas de células epiteliais mamárias com a matriz extracelular (KEELY et al., 1995; LEE et al., 2006), e em células endoteliais, também podem desempenhar papel importante no processo de angiogênese como a integrina  $\beta 3$  (STAMATOVIC et al., 2006). Além disso, receptores transmembranares como os proteoglicanos também se associam ao citoesqueleto de actina e medeiam a ligação de células epiteliais com a MEC (ARUFFO et al., 1990; UNDERHILL, 1992; FICHTER et al., 1997; ZHU et al., 1997).

O tratamento das células endoteliais com o IGF-1 e/ou a CCL2 não estimulou a expressão de CD49e (subunidade  $\alpha 5$  da integrina  $\alpha 5\beta 1$ /VLA5) e do proteoglicano transmembranar CD44. De forma semelhante, o IGF-1 não alterou a expressão da subunidade  $\alpha 3$  da integrina em HCEC (LEE et al., 2006), assim como o tratamento de células endoteliais com o fator-1 de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta 1$ ) mesmo expostas a altas concentrações de glicose não apresentaram alteração na expressão de CD44 (YEVDOKIMOVA; KOMISARENKO, 2004). Contudo, o tratamento de células epiteliais com o IGF-1 ou a CCL2 estimulou a expressão de outras subunidades de integrinas como demonstrado pelo aumento da expressão da  $\beta 1$  em HCEC após exposição com o IGF-1 (LEE et al., 2006) e da expressão do RNAm das subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  e  $\beta 3$  em células bEnd.3 tratadas com a CCL2 (STAMATOVIC et al., 2006).

Tendo em vista que não foram observadas modulações na expressão dos receptores para FN, sugere-se a avaliação da expressão da subunidade  $\alpha v$ , pois esta integrina também medeia a sinalização estimulada pela FN. As ligações de  $\alpha v\beta 3$  a FN mostraram-se menos estáveis, mas associadas à indução de transdução de sinal por ligamento e desligamento da força de adesão e assim, a reciclagem de seus contactos focais mostrou-se necessária para a migração persistente (ROCA-CUSACHS et al., 2009). Por outro lado, zonas mais interiores onde  $\alpha 5\beta 1$  predomina são menos dinâmicas (PONTI et al., 2004) e o aumento de reciclagem de  $\alpha 5\beta 1$  versus  $\alpha v\beta 3$  pára a migração, suportando um papel de  $\alpha 5\beta 1$  em estabelecer forte aderência estrutural (ROCA-CUSACHS et al., 2009).

A avaliação da fosforilação de proteínas responsáveis pela ligação celular em células ativadas, como a paxilina e a tirosina-quinase de adesão focal (FAK)

também é proposta, visto que no estudo de Nakamura e colaboradores (1998) o aumento na migração de HCEC após o tratamento com o IGF-1 em combinação com a substância P estava associado ao aumento na fosforilação destas proteínas. Além disso, FAK mostrou mediar vários eventos celulares como o crescimento, a sobrevivência e a migração celular (SCHLAEPFER et al., 1999), o crescimento das células em resposta à matriz de FN alterada (SECHLER; SCHWARZBAUER, 1998), e estar envolvida na resposta bioquímica inicial mediada por integrina à adesão da FN aos substratos (HANKS et al., 1992).

A interação ligante-integrina na superfície celular desencadeia a organização do citoesqueleto de actina em locais específicos para facilitar o desenvolvimento das células ou manter a estabilidade tecidual (CINES et al., 1998). Nas células endoteliais, este citoesqueleto encontra-se presente nas junções célula-célula, nas membranas apical e basal e principalmente em estruturas como filopódios e fibras de estresse que são semelhantes a feixes citoplasmáticos (FRACCAROLI et al., 2012).

A organização do citoesqueleto de F-actina das células endoteliais sob o efeito do IGF-1 e/ou CCL2 foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência e demonstrou que o IGF-1 não foi capaz de promover mudanças marcantes no citoesqueleto das células endoteliais, de forma semelhante ao observado por Maddala e colaboradores (2003) em células epiteliais tratadas com o fator de crescimento.

As células tEnd.1 tratadas com a CCL2 evidenciaram maiores mudanças na reorganização do citoesqueleto de actina, demonstrada pela formação de estruturas essenciais para o processo de migração celular como fibras de estresse, lamelipódios e filopódios. Em estudo anterior foi observado a ação semelhante da CCL2 na reorganização do citoesqueleto de actina em células bEnd.3 (STAMATOVIC et al., 2006). Contudo, nas células tratadas com o IGF-1/CCL2 a reorganização do citoesqueleto mostrou-se menos acentuada que a estimulada pelo tratamento apenas com a quimiocina.

A adesão e migração são primariamente mediadas através da ligação às integrinas (REINHART-KING, 2008), sendo no processo de migração requerido o delicado controle da adesão celular, de adesão e reorganização do citoesqueleto (QIN; ZHANG, 2010). No ensaio de adesão, na presença da molécula não adesiva

BSA, apenas o tratamento com o IGF-1/CCL2 estimulou a capacidade adesiva das células endoteliais. No entanto, as células tEnd.1 tratadas com o IGF-1 e/ou a CCL2 apresentaram uma maior resposta à adesão ao substrato de fibronectina quando comparado ao controle. Adicionalmente, sobre a matriz de FN o tratamento com a CCL2 ou a associação IGF-1/CCL2 estimulou a adesão das células tEnd.1 de forma significativa em relação ao tratamento apenas com o IGF-1. Estes resultados podem estar associados à formação acentuada de fibras de estresse, lamelipódios e filopódios estimulada pela CCL2 e de forma intermediária pela sua associação com o IGF-1, contribuindo para a capacidade de adesão significativa em relação ao controle e o tratamento apenas com o IGF-1, que evidenciou pouca formação destas estruturas.

A habilidade que as células tEnd.1 exibiram em migrar frente ao BSA foi estimulada somente pelo tratamento com o IGF-1/CCL2. Contudo, frente à matriz de fibronectina a migração das células endoteliais foi acentuada pelo tratamento quimiotático com o IGF-1 e/ou a CCL2. Além disso, a formação dos lamelipódios e filopódios após tratamento com a CCL2 correlacionou-se a capacidade migratória significativa.

Segundo Kiosses e colaboradores (2001), a formação de lamelipódios é importante para a migração, pois em células endoteliais de aorta bovina (BAEC) tratadas direcionalmente com o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) a formação de lamelipódios polarizados foi estimulada em suas bordas de ataque, assim como foi acentuada a expressão da integrina  $\alpha\beta3$  (77%), sugerindo que este efeito é importante para a migração celular. Estudos também demonstraram que fatores de crescimento ativam Rac para induzir a formação de lamelipódios (RIDLEY et al., 1992; KIOSSES et al., 2001), que se mostram associados à quimiotaxia (NOBES; HALL, 1999; KIOSSES et al., 2001). Ainda, os filopódios de células endoteliais mostram-se fortemente dotados de receptores de VEGF, permitindo a migração em direção ao estímulo pelo fator de crescimento (ADAIR; MONTANI, 2010).

O tratamento com o IGF-1 não estimulou a formação de lamelipódios e fibras de estresse de forma acentuada, mas induziu o alongamento celular, que é um dos eventos envolvidos no processo de angiogênese promovido pela vasodilatação e que expõe as células endoteliais à configuração plana, permitindo



o crescimento rápido (ADAIR; MONTANI, 2010). O efeito combinado de IGF-1 e CCL2 promoveu alterações intermediárias na reorganização do citoesqueleto ao unir a formação de lamelipódios, filopódios e o alongamento celular, o que contribuiu para o pico de migração endotelial.

A resposta quimiotática das células tEnd.1 à CCL2 também foi demonstrada em outras células endoteliais. HUVEC e HMEC apresentaram uma maior resposta quimiotática em câmara de Boyden após o tratamento com a CCL2 (SALCEDO et al., 2000), assim como células bEnd.3 (STAMATOVIC et al., 2006). Outros estudos também apontam o IGF-1 como sendo um fator estimulante para a migração de células endoteliais. Segundo Thum e colaboradores (2007), em câmara de Boyden o IGF-1 foi capaz de aumentar a capacidade migratória de células endoteliais progenitoras humanas e murinas quando comparado ao controle. De forma semelhante, o IGF-1 estimulou significativamente a migração das células endoteliais ECV304 através de sistema de *transwell* (IKEO et al., 2001).

A ação coestimuladora desempenhada pelo tratamento com a associação IGF-1/CCL2 potencializou a migração das células endoteliais na presença ou não de fibronectina em relação ao controle e aos outros tratamentos. Esta ação moduladora de CCL2 combinada com fatores de crescimento também foi observada por Ma e colaboradores (2007) sobre a migração de VSMC, quando estimulada por HUVEC que foram adicionadas no compartimento inferior do *transwell* e pré-tratadas com o TGF- $\beta$ 1 por 24 horas. Quando as HUVEC foram incubadas com o anticorpo anti-CCL2, a migração das VSMC foi dramaticamente reduzida mesmo após tratamento das células endoteliais com o TGF- $\beta$ 1.

A resposta quimiotática das células tEnd.1 sob o estímulo do IGF-1 e/ou CCL2 foi significativamente maior na presença da matriz de fibronectina quando comparada à migração na presença de BSA. De forma semelhante, Liu e colaboradores (2007) demonstraram que a migração direcional das BAEC foi significativamente maior quando os gradientes de fibronectina e VEGF foram combinados em relação aos gradientes compostos apenas de fibronectina ou VEGF.

A análise morfológica das células endoteliais demonstrou que a ação do IGF-1/CCL2 por 12 e 24 horas estimulou a formação de vacúolos e lumens intracelulares não observados após o tratamento apenas com o IGF-1 ou a CCL2

nestes períodos. A formação de vacúolos intracelulares distintos ou em coalescência, observados em nossos resultados constitui um dos primeiros passos no desenvolvimento de lumens em células endoteliais individuais ou grupos de células endoteliais (DAVIS; CAMARILLO, 1996; KAMEI et al., 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* suportam o modelo proposto no qual a formação e fusão intracelular e intercelular de vacúolos de células endoteliais adjacentes levam a formação de um espaço contínuo luminal necessário para o desenvolvimento do lúmen vascular *in vivo* (KAMEI et al., 2006).

O ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares (ESC) evidenciou a habilidade das células endoteliais em formar ESC quando são cultivadas em um microambiente rico em matriz extracelular e encontram-se reguladas por citocinas como o IGF-1 e/ou a CCL2. A capacidade do IGF-1 ou CCL2 de estimularem o aumento significativo na formação de ESC também foi observado por Stamatovic e colaboradores (2006), em células bEnd.3, cultivadas sobre gel de fibrina e tratadas com a CCL2 por 24 horas, como também em células endoteliais progenitoras e murinas tratadas pelo mesmo tempo com o IGF-1 sobre matrigel (THUM et al., 2007).

Dados anteriores já demonstraram o efeito sinérgico do IGF-1 com outro fator de crescimento, o VEGF. A ação conjunta destes fatores de crescimento estimulou as células endoteliais diferenciadas de células tronco da medula óssea a desenvolver uma rede de ESC após 7 dias de cultivo sobre ECM gel quando comparado ao controle (JAZAYERI et al., 2008). Assim como, a quimiocina CCL2 também demonstrou modular a ação do VEGF sobre a formação de ESC em HUVEC. O pré-tratamento com o anticorpo anti-CCL2 provocou uma diminuição significativa nas ESC formadas próximo aos níveis basais mesmo após indução com o VEGF (YAMADA et al., 2003).

O efeito sinérgico da associação IGF-1/CCL2 na formação de ESC estão sendo mostrados pela primeira vez. Ainda, além de estimular a formação de estruturas semelhantes a capilares, o tratamento com o IGF-1 e/ou a CCL2 também promoveu o aumento significativo na área luminal.

A formação do lúmen central ocorre durante o processo de tubulogênese a partir de cordões sólidos de células endoteliais (FISCHER et al., 2006). As estruturas tubulares apresentam paredes finas que são neste momento

dependentes da expressão contínua de fatores de crescimento e estão propensas a regressão (BENJAMIN et al., 1998; BENJAMIN et al., 1999; MARKKANEN et al., 2005). Em combinação com o VEGF, a Angiotensina 1 aumenta o diâmetro do lúmen (SURI et al., 1998; FISCHER et al., 2006). Entretanto, moléculas como a trombospondina-1 e *tubedown-1* suprimem a formação do lúmen vascular (GENDRON et al., 2000; FISCHER et al., 2006).

O cultivo das células endoteliais sobre a fibronectina também estimulou o aumento na área luminal de forma marcante, quando comparado ao BSA. Trabalhos apontam que a provável interação das integrinas  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha v\beta 3$  presentes na superfície das células endoteliais com a MEC é capaz de controlar a formação do lúmen (BAYLESS et al., 2000; FISCHER et al., 2006).

Em determinadas patologias em que a revascularização direta não pode ser realizada com sucesso, as terapias que revertem a insuficiência arterial grave por aumentar a circulação sanguínea são alvo de estudos pela pesquisa científica como o trabalho desenvolvido por Asahara e colaboradores (1995). Em um modelo de isquemia de membro posterior de coelhos, o aumento na circulação foi contribuído pelo aumento progressivo no diâmetro médio luminal da artéria colateral no grupo de animais tratados com a combinação de VEGF/bFGF e excedeu o grupo tratado apenas com o VEGF ou o bFGF.

O sinergismo entre o bFGF e o VEGF também foi mostrado *in vitro* por Pepper e colaboradores (1992) em relação a formação de estruturas semelhantes a capilares, permitindo a Pepper (1997) apontar a terapia com fatores de crescimento como uma alternativa potencialmente importante. Semelhantemente, o IGF-1 e a CCL2 demonstraram um sinergismo *in vitro* observado nos ensaios funcionais de formação de estruturas semelhantes a capilares, como também na migração endotelial.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos extrapolar apenas o efeito específico do IGF-1 e da CCL2 sobre as células endoteliais, visto que são necessários estudos *in vivo* para se determinar a atividade angiogênica, enquanto a especificidade sobre as células-alvo é geralmente determinada *in vitro* (FOLKMAN; SHING, 1992). Quando o fator induz a angiogênese *in vivo* e estimula a migração e proliferação *in vitro* é denominado direto, pois os dois métodos se correlacionam, mas quando o fator angiogênico não estimula *in vitro* as células

endoteliais é chamado indireto, pois a angiogênese *in vivo* pode ter sido promovida por outros fatores ou células como os macrófagos (FOLKMAN; SHING, 1992).

Sabendo-se que as pesquisas em angiogênese se apõem a três grandes áreas como: as aplicações diagnósticas, a aceleração da angiogênese em processos de cicatrização de ferimentos e a inibição da angiogênese em neoplasias (FOLKMAN; SHING, 1992), o estudo do papel do IGF-1 sobre as propriedades biológicas desempenhadas pelas células endoteliais, em ação conjunta com a quimiocina CCL2 mostrou-se de significativa importância ao fornecer mais ferramentas para a ampliação do conhecimento das funções endoteliais.

Em busca de compreender melhor as interações entre a MEC e as citocinas sobre a função endotelial é necessária a continuidade deste trabalho para determinar os mecanismos intracelulares envolvidos no sinergismo observado *in vitro* entre o IGF-1 e a CCL2 como, por exemplo, a avaliação da integrina  $\alpha_v$  e de FAK implicada em mecanismos de adesão célula-substrato.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o fator-1 de crescimento semelhante à insulina e a quimiocina CCL2 agem de forma sinérgica sobre a fisiologia das células endoteliais tímicas, modulando *in vitro*, a morfologia das células endoteliais ao induzir a formação de lumens intracelulares, sem alterar a expressão de seus receptores de superfície celular IGF-1R e CCR2; estimula a deposição de fibronectina, sem interferir na expressão de seus receptores de matriz, CD49e e CD44; promove a reorganização do citoesqueleto de F-actina; induz a adesão, migração e formação de estruturas semelhantes a capilares com areal luminal maior. Além disso, nos ensaios funcionais esta resposta biológica foi potencializada na presença de uma matriz rica em fibronectina, permitindo-nos sugerir uma potencial atividade angiogênica das citocinas frente à matriz.

## REFERÊNCIAS

- ADAIR, T. H.; MONTANI, J. P. **Angiogenesis**. San Rafael: Morgan and Claypool Life Sciences, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452444>>. Acesso em: 11 dez. 2012.
- AHRENS, T. et al. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n.1, p. 93-101, Jan. 2001.
- ALLEN, W. E. et al. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **The Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 5, p. 1147-1157, 1 June 1998.
- APLIN, A. C.; FOGEL, E.; NICOSIA, R. F. MCP-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. **Angiogenesis**, v. 13, n. 3, p. 219-226, Sept. 2010.
- ARDERIU, G. et al. Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 11, p. 2607-2615, Nov. 2011.
- ARUFFO, A. et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1303-1313, 29 June 1990.
- ASAHARA, T. et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. **Circulation**, v. 1, n. 92, p. (9 Suppl):II365-371, Nov. 1995.
- AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604-617, Aug. 2008.
- BARTOLI, C. et al. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. **Acta Neuropathologica**, v. 102, n. 4, p. 385-392, Oct. 2001.
- BAYLESS, K. J.; SALAZAR, R.; DAVIS, G. E. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1673-1683, May 2000.
- BECK, L. J.; D'AMORE, P. A. Vascular development: cellular and molecular regulation. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 5, p. 365-973, Apr. 1997.
- BELFIORE, A. et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 586-623, Oct. 2009.

BENJAMIN, L. E. et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 2, p. 159-165, Jan. 1999.

BENJAMIN, L. E.; HEMO, I.; KESHET, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development**, v. 125, n. 9, p. 1591-1598, May 1998.

BENNETT, H. S.; LUFT, J. H.; HAMPTON, J. C. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. **American Journal of Physiology**, v. 196, n. 2, p. 381-390, Feb. 1959.

BOURGUIGNON, L. Y.; JIN, H. Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor and its role in the regulation of IP<sub>3</sub>-mediated internal Ca<sup>2+</sup> release. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7257-7260, 31 Mar. 1995.

BROWN, C. E. et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3332-3341, 1 Sept. 2007.

CARMELIET, P.; COLLEN, D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 387-405, Feb. 2000.

CARY, L. A.; CHANG, J. F.; GUAN, J. L. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. **Journal of Cell Science**, v. 109, Pt 7, p. 1787-1794, July 1996.

CHARO, I. F. et al. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2752-2756, 29 Mar. 1994.

CHARO, I. F.; TAUBMAN, M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. **Circulation Research**, v. 95, n. 9, p. 858-866, 29 Oct. 2004.

CHAVES, E. B. M. **Expressão de mRNA e autofosforilação do receptor de IGF-1 (Insuline-like growth factor-1) em miométrio e mioma humano.** 2002.

Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (2002).

CHE, W. et al. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-Kappa B activation and adhesion molecule expression. **Circulation Research**, v. 90, n. 11, p. 1222-1230, 14 June 2002.

CINES, D. B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, 15 May 1998.

CONTI, E. et al. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. **Circulation**, v. 110, n. 15, p. 2260-2265, 12 Oct. 2004.

COOKE, J. P. The endothelium: a new target for therapy. **Vascular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 49-53, 2000.

COUCHMAN, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 89-114, 2010.

COX, E. A.; HUTTENLOCHER A. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. **Microscopy Research and Technique**, v. 43, n. 5, p. 412-419, 1 Dec. 1998.

COX, E. A.; SASTRY, S. K.; HUTTENLOCHER, A. Integrin-mediated Adhesion Regulates Cell Polarity and Membrane Protrusion through the Rho Family of GTPases. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 2, p. 265-277, Feb. 2001.

DALLE, S. et al. Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p.15688-15695. 11 May. 2001.

DAUGHADAY, W. H. et al. On the nomenclature of somatomedins and insulin-like growth factors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 65, n. 5, p.1075-1076, Nov.1987.

DAVIS, G. E.; BAYLESS, K. J.; MAVILA, A. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. **The Anatomical Record**, v. 268, n. 3, p. 252-275, 1 Nov. 2002.

DAVIS, G. E.; CAMARILLO, C. W. An  $\alpha 2\beta 1$  integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. **Experimental Cell Research**, v. 224, n. 1, p. 39–51, 10 Apr. 1996.

DAVIS, G. E.; SENGER, D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circulation Research**, v. 97, n. 11, p. 1093-1107, 25 Nov. 2005.

DELAFONTAINE, P.; SONG, Y. H.; LI, Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, n. 3, p. 435-444, Mar. 2004.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, June 2009.



DIVYA P, SREEREKHA PR, KRISHNAN LK. Growth factors upregulate deposition and remodeling of ECM by endothelial cells cultured for tissue-engineering applications. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 6, p. 593-602, Dec. 2007.

DRAKE, C. J.; LITTLE, C. D. VEGF and vascular fusion: implications for normal and pathological vessels. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 11, p.1351-1356, Nov. 1999.

ETHERTON, T. D. Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. **Journal of Animal Science**, v. 82 E-Suppl, p. E239-244, 2004.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629-635, 12 Dec. 2002.

FANTUZZI, L. et al. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 875-883, 1 Aug. 1999.

FICHTER, M. et al. Expression of CD44 isoforms in neuroblastoma cells is regulated by PI 3-kinase and protein kinase C. **Oncogene**, v. 14, n. 23, p. 2817-2824, 12 June 1997.

FISCHER, C.; SCHNEIDER, M.; CARMELIET, P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 176 Pt 2, p. 157-212, 2006.

FOGER, N.; MARHABA, R.; ZOLLER, M. Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. Pt 6, p. 1169-1178, Mar. 2001.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 5 June 1992.

FRACCAROLI, A. et al. Visualization of endothelial actin cytoskeleton in the mouse retina. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47488, 2012.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: SIMPÓSIO HEMOSTASIA E TROMBOSE CAPÍTULO I. Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237. 2001.

FROESCH, E. R. et al. Non-suppressible insulin-like activity of human serum. II. Biological properties of plasma extracts with non-suppressible insulin-like activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 121, p.360-374, 1966.

FUJIMOTO, T. et al. CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan. **International Immunology**, v. 13, n. 3, p. 359-366, Mar. 2001.

FURCHGOTT, R. F. et al. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 6 Suppl 2, p. S336-343, 1984.

GALLARRETA, F. M. P. et al. Gestação associada à dilatação por fluxo endotélio-dependente. **Feminina**, v. 3, n. 5, p. 269, 2009.

GALLATIN, W. M. et al. Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 12, p. 4654-4658, June 1989.

GEIGER, B.; SPATZ, J. P.; BERSHADSKY, A. D. Environmental sensing through focal adhesions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 21-33, Jan. 2009.

GENDRON, R. L.; ADAMS, L. C.; PARADIS, H. Tubedown-1, a novel acetyltransferase associated with blood vessel development. **Developmental Dynamics**, v. 218, n. 2, p. 300-315, June 2000.

GERHARDT, H. et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. **The Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 6, p. 1163-1177, 23 June 2003.

GIL, L. M. et al. A interface célula-matriz extracelular-biomaterial e a biocompatibilidade de implantes de titânio. **Innovations implant journal: biomaterials and esthetics**, v. 4, n. 3, p. 58-64, 2009.

GILLESPIE, C. M.; MERKEL, A. L.; MARTIN, A. A. Effects of insulin-like growth factor-1 and LR3IGF-1 on regional blood flow in normal rats. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 351-358, Nov. 1997.

GOEDE, V. L. et al. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. **International Journal of Cancer**, v. 82, n. 5, p. 765-770. 27 Aug. 1999.

GOLDIE, L. C.; NIX, M. K.; HIRSCHI, K. K. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. **Organogenesis**, v. 4, n. 4, p. 257-263, Oct. 2008.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 2, p. 237-268, June. 2000.

GUVAKOVA, M. A. Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 5, p. 890-909, 2007.

HAN, K. Y. et al. CCL23 up-regulates expression of KDR/Flk-1 and potentiates VEGF-induced proliferation and migration of human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 1, p. 124-128, 24 Apr. 2009.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-364, 9 Aug. 1996.

HANKS, S. K. et al. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 18, p. 8487-8491, 15 Sept. 1992.

HANSEN, M. S.; CLEMMENSEN, I. A fibronectin-binding glycoprotein from human platelet membranes. **Biochemical Journal**, v. 201, n. 3, p. 629-633, 1 Mar. 1982.

HAYES, I. M. et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 18, n. 3, p. 397-403, Mar. 1998.

HAYLOR, J.; SINGH, I.; NAHAS, A. M. Nitric oxide synthesis inhibitor prevents vasodilation by insulin-like growth factor-1. **Kidney International**, v. 39, n. 2, p. 333-335, Feb. 1991.

HELLSTRÖM, A. et al. Low IGF-1 suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. **PNAS**, v. 98, n. 10, p. 5804-5808, 8 May. 2001.

HUTCHINGS, H.; ORTEGA, N.; PLOUET, J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1520-1522, 2 Aug. 2003.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 697-706, 1995.

HWANG, J. et al. Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo. **FEBS Letters**, v. 570, n.1-3, p. 47-51, 16 July. 2004.

HWANG, J. et al. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. **Cytokine**, v. 30, n. 5, p. 254-263, 7 June. 2005.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687. 20 Sept. 2002.

IKEO, S. et al. Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on human endothelial cell migration. **American Journal of Physiology**, v. 280, n. 5, p. C1255-12561, May. 2001.

IMRIE, H. et al. Novel role of the IGF-1 receptor in endothelial function and repair: studies in endothelium-targeted IGF-1 receptor transgenic mice. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2359-2368, Sept. 2012.

JAFFE, E. A. Cell biology of endothelial cells. **Human Pathology**, v. 18, n. 3, p. 234-239, Mar. 1987.

JAFFE, E. A.; MOSHER, D. F. Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 147, n. 6, p. 1779–1791, 1 June. 1978.

JALKANEN, S.; JALKANEN, M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. **The Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 3, p. 817-825, Feb. 1992.

JAZAYERI, M. et al. Capillary network formation by endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29-35, Jan. 2008.

JOHANSSON, G. S.; CHISALITA, S. I.; ARNQVIST, H. J. Human microvascular endothelial cells are sensitive to IGF-I but resistant to insulin at the receptor level. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 296, n. 1-2, p. 58-63, 16 Dec. 2008.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v.16, n. 1, p. 3-34, Feb. 1995.

KAMEI, M. et al. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 453-456, 27 July 2006.

KEELY, P. J. et al. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. Pt 2, p. 595-607, Feb. 1995.

KING, G. L. et al. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 3, p. 1028-1036, Mar. 1985.

KIOSSES, W. B. et al. Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 316-320, Mar. 2001.

KONDO, T. et al. Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1835-42, June 2003.

KRAMER, R. H. Extracellular matrix interactions with the apical surface of vascular endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 76, p. 1-16, Jun. 1985.

KURZ, H.; BURRI, P. H.; DJONOV, V. G. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. **News in Physiological Science**, v. 18, p. 65-70, Apr. 2003.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circulation Research**, v. 100, p. 782-794, 2007.

LAMPUGNANI, M. G. et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 1, p. 203-217, Apr. 1995.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359-369, 9 Feb. 1996.

LEAVESLEY, D. I. et al. Requirement of the integrin  $\beta 3$  subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, n. 5, p. 1101-1107, 1 June 1992.

LEE, H. K. et al. Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 873-882, Mar. 2006.

LI, G. et al. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4690-4696, Nov. 2005.

LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STETLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 327-336, 25 Jan. 1991.

LIU, L. et al. Endothelial cell migration on surface-density gradients of fibronectin, VEGF, or both proteins. **Langmuir**, v. 23, n. 22, p. 11168-11173, 23 Oct. 2007.

LIU, Y. et al. Regulation of leukocyte transmigration: Cell surface interactions and signaling events. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 7-13, 1 Jan. 2004.

LIU, Y.; SENGER, D. R. Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 3, p. 457-468, Mar. 2004.

LO, C. S. PDGF-BB and IGF-I use different signaling pathways to induce NaK-ATPase subunits in cultured rat thoracic aortic smooth muscle cells. **Cell Biology International**, v. 23, n. 4, p. 251-255, 1999.

LOW-MARCHELLI, J. M. et al. Twist1 induces CCL2 and recruits macrophages to promote angiogenesis. **Cancer Research**, v. 73, n. 2, p. 662-671, 15 Jan. 2013.

MA, J. et al. MCP-1 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 987-994, 1 Feb. 2007.

MACKAY, C. R. et al. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. **The Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 1-2, p. 71-82, Jan. 1994.

MADDALA, R. et al. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 9, p. 329-336, 17 July 2003.

MARKKANEN, J. E. et al. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart-gene therapy. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 3, p. 656-664, 15 Feb. 2005.

MITCHISON, T. J.; CRAMER, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 371-379, 9 Feb. 1996.

MOSHER, D. F.; FURCHT, L. T. Fibronectin: review of its structure and possible functions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, n. 2, p. 175-180, Aug. 1981.

UNIYAPPA, R.; SOWERS, J. R. Endothelial insulin and IGF-1 receptors: when yes means NO. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2225-2227, Sept. 2012.

MURPHY, L. J. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 2, p. 97-107, Oct. 1998.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 145-176, Mar. 2000.

NAKAMURA, M. et al. Up-regulation of phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin by combination of substance P and IGF-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 1, p. 16-20, 6 Jan. 1998.

NAKAO-HAYASHI, J. et al. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 92, n. 2-3, p. 141-149, Feb. 1992.

NASCIMENTO, C. A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J. C. Estrutura orgânica do endotélio vascular, p.1-16. In: LUZ PL, LAURINDO FM, CHAGAS AC. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003.

NEW, D. D. et al. IGF-I increases the expression of fibronectin by Nox4-dependent Akt phosphorylation in renal tubular epithelial cells. **American Journal of Physiology**, v. 302, n. 1, p. C122-130, 1 Jan. 2012.

NICOSIA, R. F.; NICOSIA, S. V.; SMITH, M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 5, p. 1023-1029, Nov. 1994.

NITERT, M. D. et al. IGF-1/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 229, n. 1-2, p. 31-37, 14 Jan. 2005.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 6, p. 1235-1244, 22 Mar. 1999.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 53-62, 7 Apr. 1995.

PALECEK, S. P. et al. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. Pt 7, p. 929-940, Apr. 1998.

PAPA, V. et al. Insulin-like growth factor-1 receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 53, n. 16, p. 3736-3740, 15 Aug. 1993.

PEARSON, J. D. Endothelial cell function and thrombosis. **Baillieres Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 12, n. 3, p. 329-341, Sept. 1999.

PEPPER, M. S. et al. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 2, p. 824-831, 15 Dec. 1992.

PEPPER, M. S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, n. 4, p. 605-619, Apr. 1997.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21785-21788, 21 July 2000.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 915-928, Dec. 2008.

PONTI, A. et al. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1782-1786, 17 Sept. 2004.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cells adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32360-32369, 15 Oct. 2010.

QUTUB, A. A.; POPEL, A. S. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 13-24, 26 Jan. 2009.

RAJARAM, S.; BAYLINK, D. J.; MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 801-831, Dec. 1997.

REINHART-KING, C. A. Endothelial cell adhesion and migration. **Methods in Enzymology**, v. 443, p. 45-64, 2008.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell migration. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2713-2722, 1 Aug. 2001.

RIDLEY, A. J. et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell Press**, v. 70, n. 3, p. 401-410, 7 Aug. 1992.

RINDERKNECHT, E., HUMBEL, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 8, p. 2769-2776, 25 Apr. 1978a.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Primary structure of human insulin-like growth factor II. **FEBS Letters**, v. 89, n. 2, p. 283-286, 15 May. 1978b.

RISAU, W. et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, v. 102, n. 3, p. 471-478, Mar. 1988.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 73-91, 1995.

ROCA-CUSACHS, P. et al. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16245-16250, 22 Sept. 2009.

RUPP, P. A.; LITTLE, C. D. Integrins in vascular development. **Circulation Research**, v. 89, n. 7, p. 566-572, 28 Sept. 2001.

RUTANEN, E. M. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the endometrium. Effect of intrauterine levonorgestrel delivery. **Human Reproduction**, v. 15 Suppl 3, p. 173-181, Aug. 2000.

SACHARIDOU, A.; STRATMAN, A. N.; DAVIS, G. E. Molecular mechanisms controlling vascular lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 1-2, p. 122-143, 2012.

SALCEDO, R. et al. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7571-7578, 15 June 2001.

SALCEDO, R. et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 34-40, 1 July 2000.

SANCHEZ, O. et al. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 10, p. 1041-1047, 15 Nov. 2007.

SARIN, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. **Journal of Angiogenesis Research**, v. 2, p. 14, 11 Aug. 2010.



SCHLAEPFER, D. D.; HAUCK, C. R.; SIEG, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 71, n. 3-4, p. 435-478, 1999.

SCHNAPER, H. W.; KLEINMAN, H. K.; GRANT, D. S. Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. **Kidney International**, v. 43, n. 1, p. 20-25, Jan. 1993.

SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. **American Journal of Physiology**, v. 286, n. 6, p. C1213-1228, June 2004.

SECHLER, J. L.; SCHWARZBAUER, J. E. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25533-25536, 2 Oct.1998.

SENGER, D. R. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 1, p. 1-7, July 1996.

SHIGEMATSU, S. et al. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. **Endocrine Journal**, v. 46 Suppl, p. S59-62, Mar. 1999.

SILVA, T. H. A. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha\beta 3$ . **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, jan.-mar. 2007.

STAMATOVIC, S. M. et al. CCL2 regulates angiogenesis via activation of ETS-1 transcription factor 1. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2651-2661, 15 Aug. 2006.

STAMENKOVIC, I. et al. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 2, p. 343-348, Feb. 1991.

STOLTZ, J. F. et al. Introduction to endothelial cell biology. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 37, n. 1-2, p. 5-8, 2007.

STRIETER, R. M. et al. CXC chemokines in angiogenesis relevant to chronic fibroproliferation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 1, p. 23-26, Feb. 2005.

STRIETER, R. M. et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27348-27357, 10 Nov. 1995.

SU, E. J. et al. Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 4, p. H1429-440, Apr. 2003.

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cell in focus: endothelial cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 12, p. 1508-1512, Dec. 2002.

SURI, C. et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 468-471, 16 Oct. 1998.

TAMAROGLIO, T. A.; LO, C. S. Regulation of fibronectin by insulin-like growth factor-I in cultured rat thoracic aortic smooth muscle cells and glomerular mesangial cells. **Experimental Cell Research**, v. 215, n. 2, p. 338-346, Dec. 1994.

THUM, T. et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth hormone mediated increase of insulin-like growth factor-1. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 434-443, 16 Feb. 2007.

TOWNSON, D. H.; LIPTAK, A. R. Chemokines in the corpus luteum: Implications of leukocyte chemotaxis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 94, 10 Nov. 2003.

TSUKITA, S. et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **The Journal of Cell Biology**, v. 126, n. 2, p. 391-401, July 1994.

ULLRICH, A. et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 10, p. 2503-2512, Oct. 1986.

UNDERHILL, C. CD44: The hyaluronan receptor. **Journal of Cell Science**, v. 103, n. Pt 2, p. 293-298, Oct. 1992.

VAN DEN BRANDE, J. L. **Plasma somatomedin: Studies on some of its characteristics and on its relationship with growth hormone**. Tese de PhD apresentada a Erasmus Universiteit te Rotterdam, The Netherlands, 1973.

VAN KLEFFENS, M. et al. The IGF system during fetal-placental development of the mouse. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, n. 1-2, p. 129-135, 25 May 1998.

VERNON, R. B.; SAGE, E. H. Between molecules and morphology: extracellular matrix and creation of vascular form. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 4, p. 873-883, Oct. 1995.

WEBER, K. S. et al. Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 9, p. 2085-2093, Sept. 1999.

WEISS, N. et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 4, p. 842-857, Apr. 2009.

WICKMAN, A. et al. GH and IGF-I regulate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cardiovascular tissues of hypophysectomized female rats. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 523-533, Oct. 2002.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; SCHWARZBAUER, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. Pt 16, p. 3269-3276, 15 Aug. 2003.

WIJELATH, E. S. et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. **Journal of Vascular Surgery**, v. 39, n. 3, p. 655-660, Mar. 2004.

WILLIAMS, R. L.; COURTNEIDGE, S. A.; WAGNER, E. F. Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. **Cell**, v. 52, n. 1, p. 121-131, 15 Jan. 1988.

WRIGHT, D. E. et al. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 9, p. 1145-1154, 6 May 2002.

YAMADA, M. et al. Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 11, p. 1996-2001, 1 Nov. 2003.

YEVDOKIMOVA, N. Y.; KOMISARENKO, S. V. TGFbeta1 is involved in high glucose-induced accumulation of pericellular chondroitin sulphate in human endothelial cells. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 18, n. 5, p. 300-308, Sept-Oct. 2004.

YU, K.; RUAN, D. Y.; GE, S. Y. Three electrophysiological phenotypes of cultured human umbilical vein endothelial cells. **General Physiology and Biophysics**, v. 21, n. 3, p. 315-326, Sept. 2002.

ZHENG, H. et al. Selective recruitment of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) controls signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 18, p. 7055-7060, 1 May 2012.

ZHU, S.; NOLLE, B.; UNCKER, G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 1, p. 80-84, Jan. 1997.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, Feb. 2000.