

Angiogênese Coronariana como Resposta Endógena da Isquemia Miocárdica no Adulto

Coronary Angiogenesis as an Endogenous Response to Myocardial Ischemia in Adults

Gabriel Lorier¹, Cristina Touriño¹, Renato A. K. Kalil^{2,3}

Universidade de La Republica, Montevideo, Uruguay (UDELAR)¹; Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Fundação Universitária de Cardiologia - (IC/FUC)²; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - (UFCSA)³, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

O processo de angiogênese envolve uma sequência complexa de estímulos e respostas integradas, como estimulação das células endoteliais (CE) para sua proliferação e migração, estimulação da matriz extracelular, para atração de pericitos e macrófagos, estimulação das células musculares lisas, para sua proliferação e migração, e formação de novas estruturas vasculares.

Angiogênese é principalmente uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual e depende do acúmulo do fator de crescimento induzido pela hipóxia (FIH-1 α) na zona do miocárdio isquêmico, que serve para aumentar a transcrição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores VEGF-R, pelas CE em sofrimento isquêmico.

Esses passos envolvem mecanismos enzimáticos e proteases ativadoras do plasminogênio, metaloproteinases (MMP) da matriz extracelular (MEC) e cinases que provocam a degradação molecular proteolítica da MEC, bem como pela ativação e a liberação de fatores de crescimento, tais como: fator básico de crescimento dos fibroblastos (FCFb), VEGF e fator de crescimento insulínico-1 (FCI-1). Posteriormente, vem a fase intermediária de estabilização do novo broto neovascular imaturo e a fase final de maturação vascular da angiogênese fisiológica.

Como conclusões generalizáveis, é possível afirmar que a angiogênese coronária em adultos é, fundamentalmente, uma resposta parácrina da rede capilar preexistente em condições fisiopatológicas de isquemia e inflamação.

Introdução

Nesta revisão, aborda-se a angiogênese miocárdica endógena no adulto, sob uma ótica unificada dos diversos mecanismos moleculares descritos. Essa visão se baseia na

Palavras-chave

Isquemia miocárdica, neovascularização fisiológica, células endoteliais, adulto.

Correspondência: Renato Abdala Karam Kalil •

Av. Princesa Isabel, 370 - 90620-000 – Santana, Porto Alegre, RS, Brasil
E-mail: kalil.pesquisa@cardiologia.org.br, editoracao-pc@cardiologia.org.br
Artigo recebido em 24/03/11; revisado recebido em 13/06/11; aceito em 04/07/11.

interpretação “dinâmica” da definição cunhada por Folkman: “Angiogênese é a geração e a expansão de vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular preexistente, sob estímulos endógenos ou exógenos”¹. No adulto, angiogênese é, em grande parte, uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual e ocorre em uma ampla variedade de situações, que vão desde desenvolvimento embrionário até crescimento tumoral².

Mediando a cascata de eventos celulares e moleculares, está a ativação do FIH-1, que serve para aumentar a transcrição pelas CE, em sofrimento isquêmico, do VEGF e seus receptores VEGF-R³.

Acredita-se que a rede capilar preexistente é o lugar de início comum, no desenvolvimento e na geração dos novos capilares, mediada pelos diferentes sistemas de sinais que desencadeiam a produção de fatores de crescimento e que terminam induzindo a proliferação das células endoteliais. A definição de angiogênese feita por Folkman, citada, baseia-se em sólidos elementos anátomo-morfométricos.

A relação capilar/fibra miocárdica normal no coração do adulto é de 1 para 1, ou seja, um capilar por fibra miocárdica. O calibre máximo de novos vasos identificados no processo de angiogênese é de 200 μm de diâmetro⁴. Se não houver circulação coronária epicárdica de alimentação de dita circulação colateral com fluxo sanguíneo adequado, é provável que ocorra a regressão paulatina do processo de angiogênese. Por sua vez, cada fibra do miocárdio tem diâmetro que varia de 10 a 25 μm e o comprimento varia de 50 a 100 μm , com distribuição capilar uniforme na parede ventricular esquerda de 3.000 para 4.000/cm^{2,5}.

Portanto, podemos dizer que essa definição tem forte sustentação morfométrica. Isso significa que, no coração adulto normal em repouso, para que se mantenha a vida celular, deve existir uma fonte de nutrientes ao coração. Em outras palavras, as células progenitoras endoteliais circulantes (CPEC) requerem circulação coronariana preexistente para chegar ao local em que ocorre a isquemia miocárdica.

Ao analisar o segundo componente da definição de Folkman, quando diz: “[...] por estímulos endógenos ou exógenos...”, verifica-se que abrangeu os dois principais mecanismos do processo de angiogênese: a endógena são os processos fisiológicos e patológicos, enquanto a exógena é a terapia angiogênica cardiovascular como forma exógena de indução de angiogênese. O objetivo desta revisão é analisar os mecanismos da angiogênese endógena nos processos fisiológicos.

I. Fases da regulação dos mecanismos indutores de angiogênese miocárdica endógena no adulto:

1. Fase inicial: isquemia miocárdica como estímulo inicial

A angiogênese é, principalmente, uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual e depende do acúmulo de FIH-1 α , que, em condições de hipóxia tecidual, ativa a expressão de fatores de crescimento e inicia o processo de angiogênese na zona isquêmica, a partir da rede coronariana preexistente⁶. Além disso, a atração e o recrutamento de CPEc e macrófagos ativam, de forma parácrina, a angiogênese nessa área⁷. A expressão do VEGF-A é um indicativo do recrutamento dos progenitores mieloides no miocárdio isquêmico, enquanto as células perivasculares da angiogênese são mediadas pelos fatores derivados de células estromais (FDE)-1 (Figura 1)⁸.

Na cardiopatia isquêmica, tanto FIH-1 α quanto VEGF-A estão presentes na placa aterosclerótica, sugerindo que o FIH, por via da sinalização angiogênica, está diretamente envolvido no crescimento da placa aterosclerótica⁹.

A isquemia miocárdica grave leva ao acúmulo de FIH-1 e à expressão de fatores que estimulam brotos angiogênicos nas proximidades dos vasos sanguíneos no miocárdio isquêmico.

Não podemos esquecer que a isquemia grave e persistente causa apoptose da CE e das fibras miocárdicas. Além disso, os progenitores mieloides e endoteliais derivados da medula óssea também são recrutados para participar ativamente do apoio da angiogênese¹⁰.

O FIH-1 α é claramente importante para a angiogênese no miocárdio. No entanto, pouco se sabe a respeito do FIH-2 α . Cardiomiócitos privados de FIH-1 α específicos foram levados a redução da vascularização, alterações no metabolismo energético e anormalidade da função contrátil. Em contrapartida, a superexpressão da proteína de fusão FIH-1 α /VP16 (FIH-1 α do ADN vinculante e ativador de domínio ligado com heterodimerization VP16) foi capaz de promover a angiogênese e reduzir o tamanho de infarto em modelo experimental em rato. Tal como ocorre com outros tecidos hipóxicos, o FIH-1 α é essencial para o aumento da concentração, na medula óssea, de precursores de CE. Mesmo uma deficiência parcial de FIH-1 α , decorrente de envelhecimento, está associada a uma redução significativa na concentração dessas células e a uma pobre vascularização em músculo isquêmico¹¹.

A hipoxemia também regula a produção e a expressão do VEGF, em razão do aumento da transcrição do FIH-1 e do aumento na estabilidade do VEGF-dependente da região 3 do ARNm¹¹.

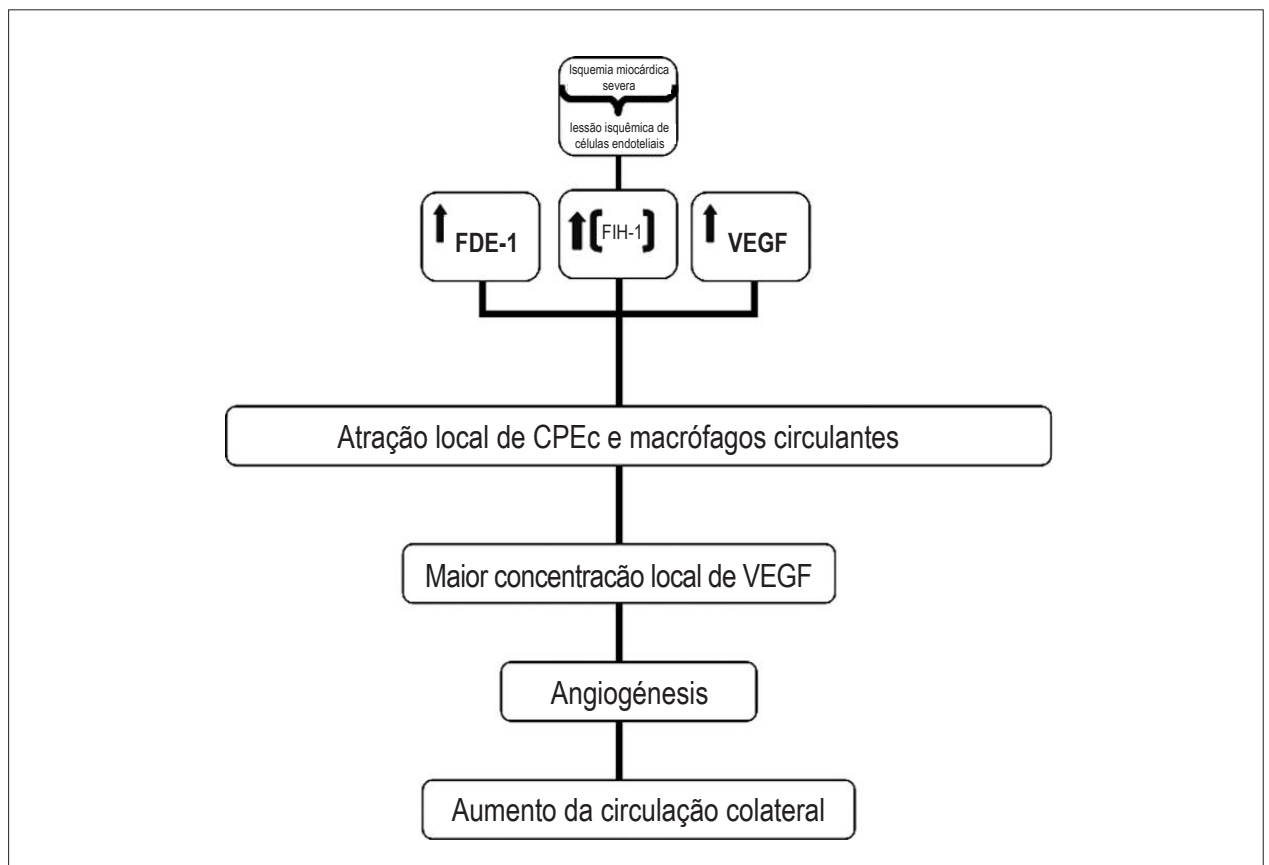


Fig. 1 – Ilustração dos mecanismos moleculares e fisiopatológicos determinantes da angiogênese miocárdica secundária à isquemia.

O mecanismo molecular iniciador da angiogênese pode ser impulsionado pela privação de oxigênio e nutrientes, como glicose, que regulam a expressão gênica. Observou-se também que a hipóxia regula os receptores TIE-2, sendo moduladores da atividade do VEGF, o que leva as CE a proliferar pelos mecanismos de brotamento ou divisão. De acordo com o padrão de sinal do VEGF e TIE-2, é possível induzir angiogênese por brotos ou intussuscepção¹². Um fato importante, de aplicação terapêutica do VEGF, é que a isquemia estimula sua expressão, bem como a de seus receptores¹³ (Figura 1).

1.1. Mecanismo de angiogênese por atração de células tronco circulantes durante o infarto agudo do miocárdio

Durante a isquemia miocárdica, o aumento da expressão e estabilização da transcrição de FIH-1 promove produção local e liberação pela CE em sofrimento isquêmico dos fatores FDE-1 e VEGF-A¹⁴. O FIH circulante regula muitos genes da angiogênese, mas a indução do VEGF talvez seja o mais notável. FIH aumenta a concentração local de VEGF em até 30 vezes, em poucos minutos. O VEGF estimula a angiogênese fisiológica e patológica em estrita resposta dose-dependente⁶. Esses mediadores são capazes de aumentar a mobilização e o recrutamento das CPEc na área isquêmica¹⁵.

O aumento da expressão de FDE-1 é essencial para regulação da atração, migração e retenção seletiva, no tecido miocárdico isquêmico, das CPEc ou das CE com o receptor de superfície 4 da quemoquina CXC-R4¹⁶. Isso significa que a via FIH-1 é o mecanismo de unificação do sistema de sinalização da angiogênese, no contexto do infarto agudo do miocárdio (Figura 1).

Essas CPEc, do mesmo modo que ocorre com as células mesenquimais da medula óssea (entre outras), são mobilizadas, atraídas e deslocadas da circulação periférica para as áreas de isquemia miocárdica¹⁷.

Há evidência de que FDE-1 com o receptor de sinal CXC-R4 + desempenha papel importante no recrutamento de células circulantes da medula óssea no contexto de uma grave isquemia miocárdica. Esse sinal é essencial para o recrutamento de células-tronco no coração. O CXC-R4 + é um receptor de superfície celular da FDE-1, expresso nas CPEc e nas células-tronco circulantes hematopoéticas (CTHc)¹⁸.

As CPEc desempenham papel importante na manutenção da parede vascular endotelial, auxiliando na reendotelização (mudança fisiológica das CE) e na angiogênese¹⁹.

No entanto, os níveis de FDE-1 endógeno secretado diminuem após o IAM e retornam ao nível normal após o 4º ou 7º dias do IAM²⁰.

As células mesenquimais circulantes derivadas da medula óssea (CMcDMO) constituem uma ponte para o interior de miocárdio isquêmico, expresso pelo FDE-1, que poderá ser um sinal facilitador para a migração de células circulantes e da medula óssea¹⁷.

Acreditava-se que os precursores endoteliais existiam apenas durante a vida embrionária. Atualmente, foram identificados precursores na medula óssea e em vasos periféricos no adulto. Alguns fatores de crescimento, como o fator estimulador de

colônias de granulócitos (FECG), b-FCF e FCI-1, estimulam sua diferenciação e sua mobilização²¹. Esses precursores de células endoteliais colonizam novas áreas de brotos angiogênicos no adulto e, no futuro, podem ser alvos terapêuticos.

Rehman e cols.²² têm questionado a origem dessas CPEc e sua verdadeira incorporação na parede dos vasos em crescimento. Descobriram que a maior parte das chamadas CPEc deriva de monócitos/macrófagos, com apenas uma pequena população de células-tronco CD-34⁺/células progenitoras hematopoéticas a partir de células tronco/angioblastos. Esses monócitos/macrófagos secretam múltiplos fatores de crescimento angiogênicos, que promovem, com sua estimulação parácrina, o crescimento neovascular²².

O conceito de CPEc é muito atrativo, porém, mais de uma década após sua descoberta, ainda não existem marcadores específicos das CPEc e os resultados dos ensaios clínicos ainda são controversos. Empregando um enfoque proteômico, um estudo recente mostra que as células com fenótipo de CPEc poderiam ser células mononucleares circulantes com a incorporação de micropartículas de plaquetas²³.

Schmeisser e cols.²⁴ demonstraram que o monócito CD-34⁺ pode desenvolver *in vitro* um fenótipo endotelial e tomar forma em uma estrutura tubular, o que sugere um potencial papel dos monócitos na angiogênese²⁴.

Finalmente, Ziegelhoeffer e cols.²⁵ publicaram um estudo que aponta para o fato de que, no organismo adulto, as células-tronco provenientes da medula óssea não promovem crescimento vascular pela incorporação nas paredes vasculares, mas sim através de múltiplos efeitos parácrinos de citocinas angiogênicas²⁵.

Resumindo: a angiogênese é um mecanismo fisiológico organizado sob rigorosa regulação, com muitos fatores que influenciam o processo ativo em nível molecular, incluindo muitos polipeptídeos solúveis, como VEGF, angiopoietina, FCF, fatores de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator de crescimento transformador β (FCT- β), fator de necrose tumoral (FNT)- α , FECG, entre muitos outros²⁶.

1.2. Mecanismo de angiogênese endógena por ativação de células-tronco residentes no coração

O verdadeiro papel desse mecanismo e da quantificação de seu efeito angiogênico é incerto. Células-tronco residentes do miocárdio (CTRM) foram capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, células endoteliais e células musculares lisas²⁷. Essas CTRMs expressam receptores para FCH e para FCI-1, que podem levar ao recrutamento e à proliferação das CE e repor algumas funções do coração com dano isquêmico. Assim como ocorre com as células mesenquimais circulantes (MSCc), que são capazes de secretar FCH e FCI-1 em resposta à lesão²⁸.

1.3. Proliferação de células endoteliais como resposta final comum da isquemia miocárdica: geração de broto vascular angiogênico

Em adultos, esse processo se deve, principalmente, à hipoxemia e se encontra mediado pela ativação de FIH-1 α , que serve para aumentar a transcrição do VEGF e seus receptores VEGFRs².

O VEGF estimula a angiogênese fisiológica e patológica em estrita relação dose-dependente²⁹. O VEGF é uma proteína que tem a característica específica de estimular a replicação de células endoteliais vasculares, essenciais para a angiogênese³⁰. O VEGF-A se liga a dois receptores tirosina-quinase (RTK), VEGFR-1 (flt-1) e VEGFR-2 (KDR, Flk-1). Receptores tirosina-quinase flt-1 (VEGF-R1) constituem a segunda maior afinidade para o VEGF. Embora não tão específico, o receptor flk-1 não compartilha afinidades com células do sistema inflamatório, como, por exemplo, monócitos ou células cancerosas, ao contrário do receptor flt-1. Num recente e elegante trabalho da Universidade de Leuven, fez-se importante descoberta com implicações terapêuticas para o futuro, qual seja, a relativa especificidade do VEGF-B, em termos de sua atividade angiogênica no tecido miocárdico isquêmico³¹.

No mecanismo da angiogênese, devido ao crescimento vascular em forma de broto vascular, é possível determinar os seguintes passos de maneira simplificada:

- a) vasodilatação inicial, processo que envolve óxido nítrico e VEGF³²;
- b) aumento da permeabilidade vascular em resposta ao VEGF, como extravasamento de proteínas plasmáticas que funcionam como suporte para a migração das células endoteliais (CE). O aumento da permeabilidade é produzido pela formação de fenestrações organo-vesiculares e pela redistribuição das moléculas de adesão celular endotelial plaquetária³³;

c) degradação proteolítica da MEC: as proteinases expõem proteínas da MEC degradada, como colágeno IV e monômero de colágeno fibrilar, que induzem a migração de CE e CML³⁴.

Os três passos descritos envolvem mecanismos enzimáticos que incluem a Ang2, um inibidor de TIE2³⁵, proteases ativadoras do plasminogênio, metaloproteinases (MMP) da MEC e cinases ou família das heparinases.

Todas as proteases influenciam na angiogênese através da degradação molecular proteolítica da MEC, e da ativação e liberação do fator de crescimento, como bFGF, VEGF e IGF1, sequestrado na matriz extracelular (Quadro 8 na Figura 2)³⁶. Também exercem ação proteolítica o fator de crescimento transformador (FCT) e a ativação proteolítica de quimioquinas angiogênicas como o IL-1. Ou seja, durante o remodelamento vascular por brotação, ocorre degradação proteolítica, incluindo ativadores de plasminogênio como a urocinase ativadora do plasminogênio (UPA) e seu inibidor PAI-1, matriz metaloproteinases (MMPs) e inibidores da metaloproteinases dos tecidos (TIMPs), heparinases, quinases, tirosinases e caderinas³⁷.

Ao analisar o papel crítico da degradação proteolítica da MEC no crescimento e na manutenção do broto angiogênico, devem ser considerados os limites de tempo de dito processo. O processo também deve ser equilibrado, porque degradação insuficiente impede que as células vasculares deixem suas posições originais. Por outro lado, a excessiva degradação

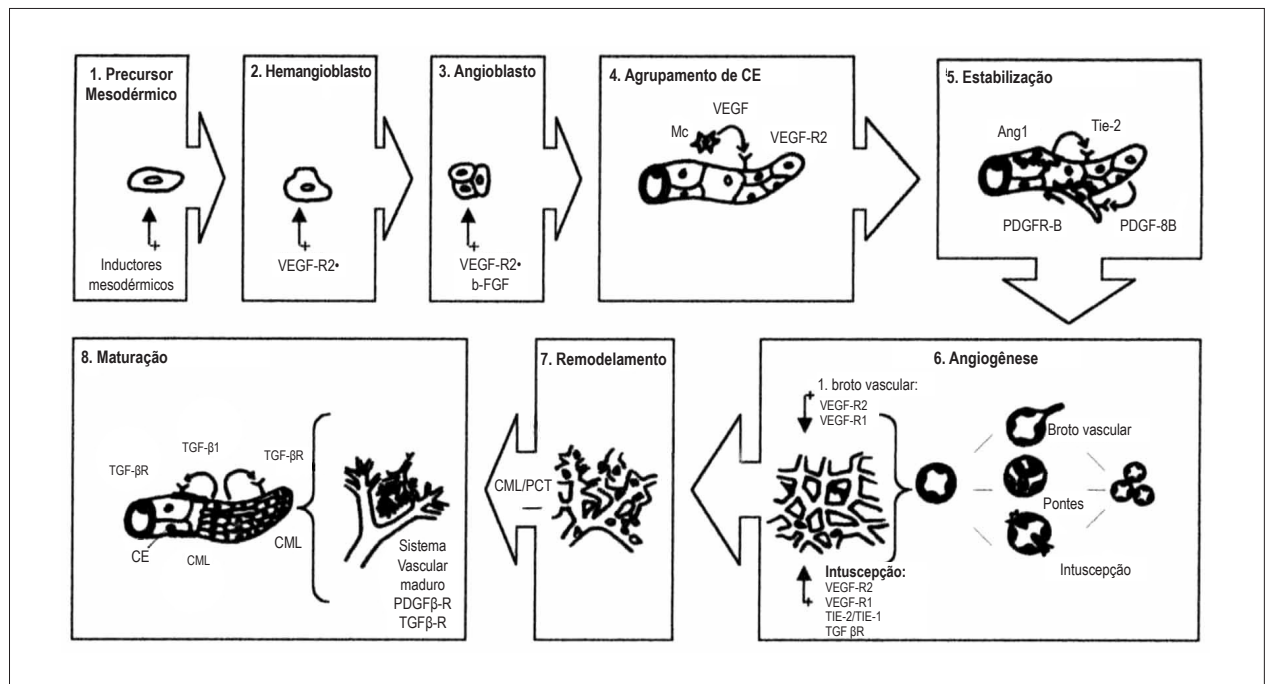


Fig. 2 – Formação dos plexos vasculares primários do mesoderme, durante a fase embrionária. Os hemangioblastos e a bipotencialidade de seus precursores representam o passo intermediário dos precursores endoteliais (os angioblastos); na etapa embrionária, formam a rede vascular primitiva chamada vasculogênese e, na vida adulta, expandem-se e remodelam-se, levando à angiogênese (Quadros 3 e 4). No Quadro 5, está a fase de estabilização, representada pela união das CE pela ação do VEGF e do FCDP-β, que recruta os pericitos e as células do músculo liso, cobrindo as células endoteliais durante a estabilização do vaso. A angiopoietina – 1 (Ang-1) e FCT-b1 estabilizam o nascente vaso. A Ang-2, na ausência de fatores de crescimento, provoca a regressão do broto nascente. No Quadro 6, ilustram-se os processos angiogênicos de intussuscepção e por surto. Nos Quadros 7 e 8, ilustram-se as fases de remodelamento e maturação do vaso nascente. CML: células do músculo liso; PCT: pericitos. União do VEGF com as células endoteliais (CE), FCDP-β recruta pericitos (PC). Adaptado de Carmeliet.

Atualização Clínica

impede o apoio e a orientação para a migração das CE e, conseqüentemente, também a angiogênese³⁸.

No processo de angiogênese, uma vez produzida a degradação proteolítica da MEC, seguida por fragmentação da membrana basal, produz-se a migração quimiotática das células endoteliais através da membrana basal. Para que isso aconteça, é necessário que as conexões intercelulares endoteliais sejam degradadas. Quando as CE migram para formar novos brotos, a MEC sofre degradação proteolítica e mudanças em sua composição (Figura 3).

A migração das CE ocorre 24 horas antes dos seguintes processos:

- proliferação;
- adesão e reestabelecimento de contatos intracelulares;
- formação do lúmen vascular;
- maturação funcional do endotélio.

Como se pode apreciar, as proteases desempenham papel crítico no processo de angiogênese³⁹.

A estimulação do VEGF sobre os receptores de membrana tirosina-quinase das células endoteliais vasculares é expressa através de membros de gens Src da família das tirisina-quinase, como o Src, Fyn, Yes, que regulam múltiplas funções intracelulares. Em primeiro lugar, Src, Fyn e Yes desempenham, cada qual, papel único no sistema de sinalização mitogênica do VEGF. Em segundo lugar, eles contribuem para a modulação do VEGF na migração celular. Em terceiro lugar, Fyn desempenha papel único na indução de VEGF para a formação do tubo neovascular. O Fyn tem um efeito regulador negativo sobre a migração e a estabilização do tubo neovascular induzido pelo VEGF. Esses resultados fornecem provas diretas de que Src, Fyn e Yes têm importante papel na regulação do VEGF nos eventos mediados pelas células endoteliais⁴⁰.

A existência de tubos com pericitos reflete o início precoce da participação de pericito na angiogênese intussusceptiva (ver Quadro 4 da Figura 2). A criação de uma rede vascular funcional exige que os brotos vasculares emergentes madurem e permaneçam funcionais ao longo do tempo. A associação do

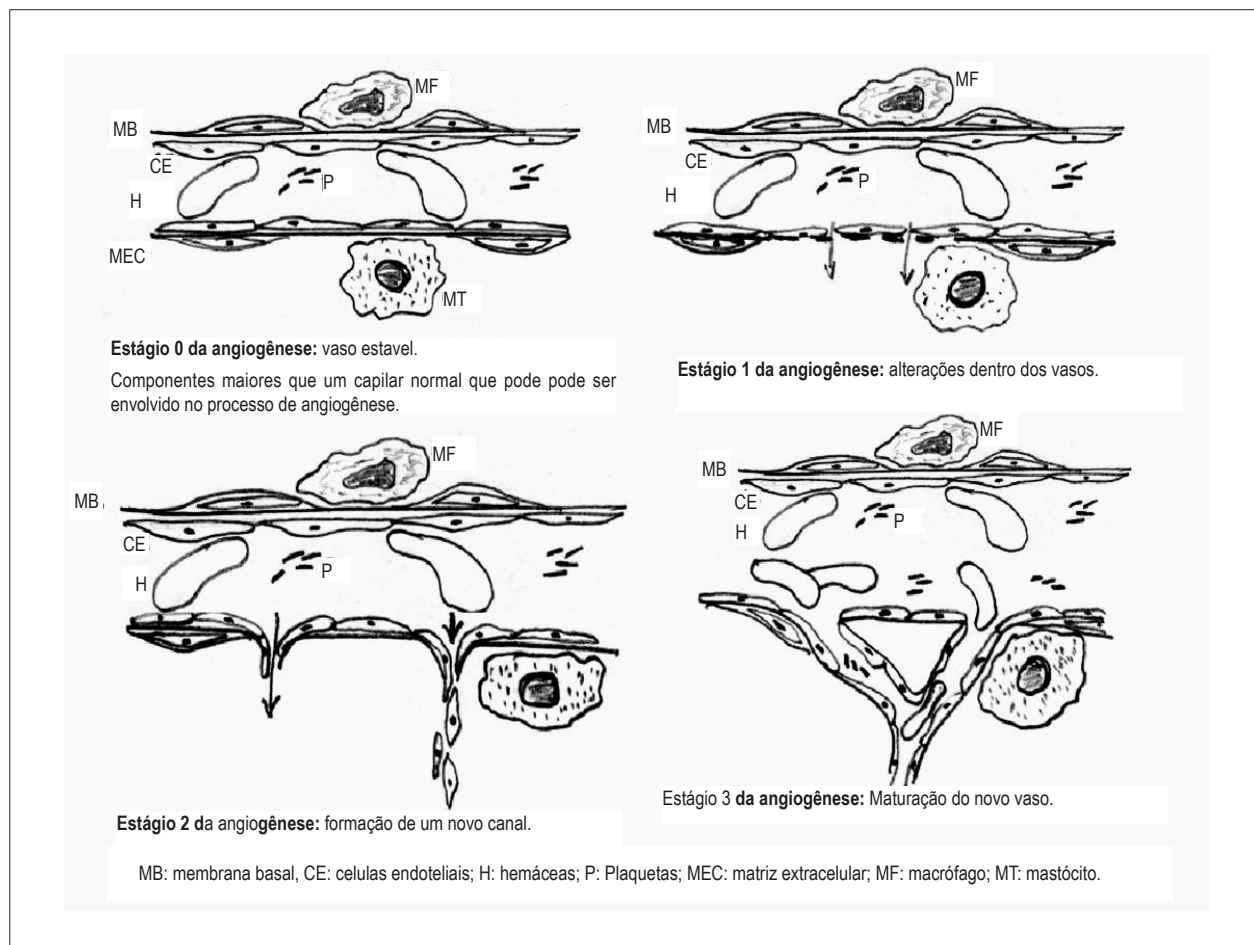


Fig. 3 – Esquema detalhado do processo de angiogênese, mostrado no estágio 1: dilatação do vaso, ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas, secreção de ativadores do plasminogênio e enzimas proteolíticas, desgranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, ruptura da membrana basal e aumento de permeabilidade com saída de fibrina e outras proteínas; no estágio 2: formação de pseudópodos, degradação da matriz extracelular, migração de células endoteliais para o espaço extravascular com sua proliferação e formação de brotos de tecido vascular; e no estágio 3: nova membrana basal e maturação da nova parede vascular para estabelecimento do fluxo sanguíneo, formação de tubos e conexões, além de novos vasos.

pericito e do CML com os brotos de recente formação das CE regula sua proliferação, sobrevivência, migração, diferenciação, ramificação vascular, fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular. A participação precoce dos pericitos no desenvolvimento da microvasculatura tem importantes implicações para a intervenção terapêutica em muitas doenças⁴¹.

O fluxo sanguíneo, com sua pressão sobre a nova parede vascular, interage de forma integrada e dinâmica com o citoesqueleto e a MEC. O fluxo sanguíneo contínuo estimula a proliferação das células endoteliais e regula VEGF, integrina α V β 3, PECAM-1 e VE-caderina. A tensão de cisalhamento ("shear stress") estimula a proliferação de células endoteliais e, conseqüentemente, aumenta o diâmetro do vaso⁴².

A MEC fornece os contatos necessários entre as CE e os tecidos circundantes, impedindo que os brotos neovasculares degenerem. Uma matriz de colágeno intersticial e elastina entre as células vasculares oferece propriedades de viscoelasticidade e resistência à parede do vaso. A MEC também regula a formação do novo broto vascular. Quando as células endoteliais migram para formar novos brotos vasculares, a matriz não apenas é rompida proteoliticamente, como também sua composição é alterada. Proteinases expõem novos epítomos nas proteínas da MEC (por exemplo, o colágeno IV) ou alteram sua estrutura (monômeros de colágeno fibrilar), levando à migração das CE e CML³⁴. Além disso, fibronectina, fibrina e outros componentes da matriz fornecem um andaime para o apoio e as orientações das CE.

As integrinas são receptores de superfície celular específicos da MEC, que, por transmissão de informações bidirecionais entre o exterior e o interior de células vasculares, ajudam a construir novos brotos vasculares de maneira coordenada. As integrinas α 5 β 3 e α 5 β 5 têm sido, há muito tempo, consideradas um regulador positivo da angiogênese, porque seus antagonistas farmacológicos suprimem a angiogênese patológica⁴³.

O fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP) - β e de seu receptor FCDP-R β desempenha papel essencial na estabilização dos vasos sanguíneos nascentes, recrutando células mesenquimais FCDP-R β positivo. A falta de recrutamento das CE tem como resultado um crescimento neovascular patológico, o que provoca: alteração da permeabilidade neovascular, fragilidade neovascular, sangramento, insuficiência de perfusão e hipóxia em embriões que têm carência de FCDP- β ⁴⁴. Em vez disso, uma combinação de FCDP- β e VEGF resulta na formação de brotos vasculares mais maduros do que em monoterapia com qualquer dos fatores. Isso é muito importante para o futuro desenvolvimento de estratégias terapêuticas da angiogênese.

Outro sistema de sinalização envolvido na manutenção, crescimento e estabilização do broto neovascular nascente é o receptor TIE-2, que liga as angiopoietinas Ang-1 e Ang-2. Diferentemente da Ang-2, que ativa a TIE-2 em algumas células, mas bloqueia a TIE-2 em outras, a Ang-1 consistentemente ativa o receptor TIE-2. A Ang-1, por sua vez, compacta os brotos neovasculares nascentes, através das moléculas de ligação, e promove interação entre as CE das paredes como um adesivo de proteínas e contração de pericitos. A atividade angiogênica da Ang-2 está em sinergia com o VEGF para estimular a angiogênese no coração, mas, quando os sinais não

são suficientes, causa a morte das CE e a regressão do broto neovascular nascente. Ou seja, os sinais de ativação TIE-2 devem funcionar como uma balança de precisão⁴⁵.

2. Fase intermediária: a estabilização do novo broto neovascular imaturo

O broto nascente neovascular é estabilizado através do recrutamento de células murais e pela geração de uma nova MEC. Pelo menos quatro vias moleculares estão envolvidas na regulação desse processo: FCDP e seu receptor β (FCDP-R β); esfingosina-1/fosfato-1 (S1P1); fator de diferenciação endotelial (receptor proteína esfingosina G-1 (EDG1); Ang1-TIE-2 e o FCT. O FCDP- β é secretado pela CE, presumivelmente em resposta ao VEGF. Embora o FCDP- β seja expressado pelas CE e as células murais, são estas as responsáveis durante a fase de maturação da angiogênese. Também são essenciais, para a formação e a estabilização do broto neovascular, os receptores TIE-1 e TIE-2, e os dois ligantes para TIE-2, como Ang1 e Ang2. As principais fontes de Ang1 e Ang2 são, respectivamente, as CE parietais e as CE de órgãos específicos. O Ang1 é conhecida pela estabilização dos brotos vasculares emergentes e por torná-los resistentes à fuga entre conexões intercelulares. Na ausência de VEGF, a Ang2 atua como um antagonista da Ang1 e desestabiliza o broto neovascular nascente, levando, finalmente, à sua regressão. Na presença de VEGF, Ang2 facilita a angiogênese. O FCT- β 1 é uma citocina multifuncional que promove o ciclo de maturação do broto neovascular em desenvolvimento pela estimulação da MEC, ao estimular a indução e a diferenciação de células mesenquimais em CE murais⁴⁶.

3. Fase final: maturação vascular da angiogênese fisiológica

Os determinantes moleculares de maturação neovascular podem ser agrupados em três categorias: I) União dos fatores de crescimento a um tipo de receptor celular, com seu efeito correspondente; II) Regulação molecular das interações celulares; III) Regulação molecular das interações entre as células endoteliais e a matriz extracelular.

I) União dos fatores de crescimento a um tipo de receptor celular, com seu efeito correspondente:

a) Receptores de CE flt1y, flk1 (VEGF-R1, VEGF-R2): 1) Regulação das proteases na organização da MEC; 2) Geração da MEC provisória, que permite aumentar a permeabilidade; 3) Regulação do FCDP- β , que recruta as células para estabilizar a parede do vaso nascente; 4) Supressão da apoptose nos vasos nascentes; 5) Estabilização das CE.

b) FCDP-R β ; Ang1/TIE-2: 1) Promoção de proliferação, migração e recrutamento das células murais; 2) Estabilização de vasos nascentes, o que facilita as interações entre as junções intercelulares (CE-CE, CE-MEC); 3) Supressão da apoptose das CEC.

c) Ang2/TIE1: induz apoptose das CE, na ausência de VEGF.

d) Ang1/TIE1: coordenam a polaridade vascular.

e) FCT- β 1/FCT- β R11:

1) Promovem a produção de proteases e MEC.

2) Promovem a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos.

Atualização Clínica

- f) FCT- β 1/ALK1 regulam a proliferação e a migração de CE.
- g) FCT- β 1/ALK5: regulam a maturação dos novos vasos.
- h) FCT- β 1/ALK1 e a endoglinina: promovem a especialização arterial e venosa.

II) Regulação molecular das conexões intercelulares:

- a) V caderina: forma as uniões entre as CE.
- b) N-caderina: faz conexões entre as células da parede celular e as CE.
- c) Conectinas: estabelece conexões entre as CE e as CE e células parietais.

III) Regulação molecular das interações entre as CE e a MEC:

- a) α 5 β 1, α 1 β 1, α 2 β 1, α v β 3, α v β 5: supressão da apoptose de CE.
- b) Proteases: em sua ação enzimática, promovem a produção da MEC, como, por exemplo, a clivagem do colágeno XVIII para endostatina, o plasminogênio, a angiotensina e proteases como MMP2 e PEX.
- c) Proteases inibitórias: evitam a degradação proteolítica da MEC para estabilizar o vaso.

Esses dados suportam, de forma consistente, a hipótese de que Ang2 e VEGF levam à formação dos brotos neovasculares, enquanto Ang1 está envolvida na estabilização do broto, por interação das CE e da célula mural⁴⁶.

3.1. Formação do lúmen vascular

Durante o processo de angiogênese, ocorrem migração e proliferação de CE por aproximadamente 24 horas, período durante o qual as proteases desempenham papel crucial⁴⁶. A proliferação é registrada no nível das CE e CML⁴⁷.

O processo de formação do lúmen vascular é uma fase coordenada de adesão molecular-celular durante a extensão do vaso sanguíneo. As moléculas específicas responsáveis pela extensão do vaso não são bem conhecidas⁴⁸.

O receptor TIE-2 e de CE é necessário para o desenvolvimento de vasos sanguíneos, bem como para sua manutenção e reparação. A Ang foi identificada como ligante específico para o receptor TIE-2. Como já citado, Ang-1 é um agonista dos receptores TIE-2 que promove a sobrevivência das CE e reduz a permeabilidade vascular⁴⁹.

Em contraste com a Ang-1, a Ang-2 foi inicialmente descrita como antagonista que bloqueia a TIE-2/Ang-1 e leva à ativação do TIE-2, o que resulta na apoptose das CE. No sistema de sinalização das CE para sua sobrevivência e migração, o TIE-2 é componente essencial do desenvolvimento da vasculogênese embrionária, assim como da angiogênese no adulto. Trabalhos recentes identificaram uma proteína tirosina fosfatase beta como uma nova CE-fosfatase específica que regula a sinalização Ang-1-TIE-2 das CE. Assim, estratégias orientadas para HPTP- β podem ser benéficas à sinalização da Ang1 e, portanto, melhoram a formação e a maturação dos neovasos no contexto da angiogênese terapêutica. Além disso, é possível concluir que a hipóxia aumenta a expressão de HPTP- β e diminui

a fosforilação da TIE-2, o que lança nova luz sobre o papel potencial da angiogênese do HPTP- β . A indução de HPTP- β pela hipóxia pode representar um importante mecanismo regulador de ativação do TIE-2 na angiogênese patológica⁵⁰.

Em resumo, as CE têm um receptor tirosina-quinase seletiva; o TIE-2 e seus ligantes, a angiopoietina Ang-1 e Ang-2, por sua vez, são essenciais para a manutenção e a reparação dos vasos sanguíneos. A Ang-1 é um agonista da ativação dos receptores TIE-2. No entanto, a Ang-2 é contexto-dependente, ou seja, pode ser antagonista ou agonista. A proteína tirosina-fosfatase beta (HPTP- β) desempenha papel relevante na sobrevivência das células endoteliais, modulando a sinalização de Ang-1-TIE-2.

3.2. Permeabilidade neovascular

O VEGF leva à proliferação e à migração das CE no processo da angiogênese. Foi inicialmente identificado como fator de permeabilidade vascular (VPF). Muitas evidências sugerem que a angiogênese é precedida e/ou acompanhada de aumento da permeabilidade⁴.

Os mecanismos pelos quais VEGF/VPF aumentam a permeabilidade vascular (PV) persistem desconhecidos. Murohara e cols.⁵¹ identificam o óxido nítrico (ON) na regulação da PV, enquanto van der Zee e cols.⁵² identificaram, *in vitro*, que o VEGF/VPF estimula a produção de ON no endotélio macrovascular.

Isner⁴ demonstrou a ação sinérgica entre ON e prostaciclina produzida pela interação do VEGF/VPF com seu receptor Flk-1/KDR/VEGF-R2 como mediador da permeabilidade vascular induzida por VEGF/VPF, constituindo uma propriedade única do VEGF/VPF entre as citocinas angiogênicas. Quando as proteases foram avaliadas por sua capacidade de aumentar a permeabilidade pelo teste de Miles, o VEGF foi o único a aumentar a permeabilidade – o mecanismo de ação, contudo, é desconhecido. O óxido nítrico tem sido implicado como um fator regulador da permeabilidade, dependendo de sua concentração local⁴.

Existem três tipos diferentes de permeabilidade vascular:

- 1) permeabilidade da membrana basal vascular (PBV), presente nos tecidos normais;
- 2) aumento da permeabilidade vascular produzido em resposta a uma única e breve exposição a VEGF-A ou a outros agentes;
- 3) aumento crônico da permeabilidade vascular, que caracteriza a angiogênese patológica.

Finalmente, observou-se que o VEGF-A varia significativamente em diferentes cepas do rato, e é provável que a resposta da permeabilidade, tanto basal quanto induzida por alguns fatores, também difere em camundongos com diferentes estruturas genéticas, embora isso ainda não tenha sido investigado de forma sistemática⁵³.

II. Respostas das Células Vasculares à Hipóxia

A hipóxia leva ao aumento da sinalização através da transcrição do FIH-1.

1. Células endoteliais

Existem dois mecanismos identificados na hipoxemia que estão ligados à angiogênese ou ao seu bloqueio: um, que promove a proliferação e a sobrevivência através de CE pela ativação de receptores VEGF de sinalização e expressão de eNOS e, outro, que inicia a apoptose. Os resultados podem depender da gravidade da hipóxia. Hipoxemia moderada promove, principalmente, proliferação e sobrevivência, enquanto hipoxemia grave, próxima a condições anaeróbicas, pode causar apoptose significativa. *In vivo*, o acúmulo de FIH decorrente de apoptose de CE não tem sido reportado⁶.

2. Células musculares lisas vasculares

Tal como ocorre com as células endoteliais, a hipoxemia grave provoca apoptose das CML, enquanto a hipoxemia moderada aumenta sua proliferação. Induzida por hipóxia, a expressão da ciclo-oxigenase (COX)-2 e FCDP- β é importante para os receptores de CML que estimulam sua proliferação. O mecanismo preciso é desconhecido, mas uma possibilidade é que o MT1-MMP possa agir como uma molécula acessória da atividade proteolítica associada com receptor FCDP- β ⁴⁵.

3. Macrófagos

Em resposta à hipoxemia tecidual, um grande número de monócitos é recrutado da circulação para os tecidos hipóxicos, onde se diferenciam em macrófagos. Vários fatores e proteínas nos tecidos hipóxicos contribuem para o recrutamento dos monócitos, a saber: proteína-1 (MCP-1), FNT- α , FEC-1, fator derivado estromal (FDE)-1 e VEGF-A. Os macrófagos promovem a angiogênese ao estimular a secreção de metaloproteínas da matriz (MMP) e uma variedade de fatores angiogênicos, tais como VEGF-A, FCF, interleucina-2 e fator de necrose tumoral.

Além disso, os macrófagos também secretam um curto peptídeo de 39 resíduos de aminoácidos (PR39), que podem facilmente atravessar a membrana plasmática, entrar nas células e inibir a degradação do FIH- α . Essa função do PR39 pode melhorar a capacidade das células residentes dos tecidos hipóxicos de secretar fatores angiogênicos, devido ao aumento da concentração local de FIH-1⁶.

Finalmente, também os macrófagos respondem à hipoxemia através da produção de uma proteína reguladora de oxigênio (PRO) pelo retículo endoplasmático e que promove a secreção de VEGF-A pelo mesmo retículo endoplasmático⁶.

Conclusão

De forma geral, a angiogênese coronária em adultos é, fundamentalmente, uma resposta potente parácrina da rede capilar preexistente em condições fisiopatológicas de isquemia e/ou de inflamação. A pesquisa básica e o entendimento dos mecanismos são necessários, a fim de dar suporte às grandes lacunas no conhecimento e possibilitar a execução de efetivas estratégias no campo da terapia angiogênica coronariana.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Gabriel Lorier pela IC/FUC.

Referências

1. Kornowski R, Epstein SE, Leon MB. Handbook of myocardial revascularization and angiogenesis. London: Martin Dunitz Ltd; 1999.
2. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992;267(16):10931-4.
3. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. Cardiovasc Res. 1999;43(4):835-7.
4. Isner JM. Angiogenesis. In: Topol EJ, ed. Textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1998. p. 2491-518.
5. Gottschall C. Função cardíaca: da normalidade à insuficiência. São Paulo: BYK; 1995.
6. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med. 2003;9(6):677-84.
7. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7(4):430-6.
8. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. Cell. 2006;124(1):175-89.
9. Vink A, Schoneveld AH, Lamers D, Houben AJ, van der Groep P, van Diest PJ, et al. HIF-1 α expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. Atherosclerosis. 2007;195(2):e69-75.
10. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. Cardiovasc Res. 1994;28(8):1176-9.
11. Semenza GL. Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1: molecular mechanisms of oxygen homeostasis. Trends Cardiovasc Med. 1996;6(5):151-7.
12. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386(6626):671-4.
13. Henry TD. Can we really grow new blood vessels? Lancet. 1998;351(9119):1826-7.
14. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat Med. 2004;10(8):858-64.
15. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. Ann Thorac Surg. 2000;70(3):829-34.
16. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(12):2664-70.
17. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. Ann Thorac Surg. 2005;80(1):229-36.

Atualização Clínica

18. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107(9):1322-8.
19. Jo DY, Hwang JH, Kim JM, Yun HJ, Kim S. Human bone marrow endothelial cells elaborate non-stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)-dependent chemoattraction and SDF-1-dependent transmigration of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol*. 2003;121(4):649-52.
20. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110(21):3300-5.
21. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2000;80(1):99-115.
22. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107(8):1164-9.
23. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*. 2009;114(3):723-32.
24. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):671-80.
25. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinkel R, Helisch A, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004;94(2):230-8.
26. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(5):C947-70.
27. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
28. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(25):8966-71.
29. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967-74.
30. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25.
31. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
32. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6(4):389-95.
33. Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:85-96.
34. Hangai M, Kitaya N, Xu J, Chan CK, Kim JJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1429-37.
35. Carmeliet P. Developmental biology: controlling the cellular brakes. *Nature*. 1999;401(6754):657-8.
36. Carmeliet P. Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ Res*. 2000;87(3):176-8.
37. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):346-55.
38. Lutun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2(5):407-16.
39. Isner JM, Takayuki A. Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci*. 1998;3:e49-69.
40. Werdich XQ, Penn JS. Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis*. 2005;8(4):315-26.
41. Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*. 2003;6(3):241-9.
42. Tomanek RJ. Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*. 2005;8(3):273-84.
43. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*. 2002;8(9):918-21.
44. Montrucchio G, Alloati G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1669-99.
45. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-70.
46. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-93.
47. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol*. 1994;267(4 Pt 2):H1263-71.
48. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2260-8.
49. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995;91(11):2687-92.
50. Yacyshyn OK, Lai PF, Forse K, Teichert-Kuliszewska K, Jurasz P, Stewart DJ. Tyrosine phosphatase beta regulates angiopoietin-Tie2 signaling in human endothelial cells. *Angiogenesis*. 2009;12(1):25-33.
51. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99-107.
52. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 1997;95(4):1030-7.
53. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109-19.