

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
ÁREA DE BIOTECNOLOGIA

FERNANDA KATHARINE DE SOUZA LINS BORBA

Estudo da atividade dos sulfatos de condroitina e glucosamina na formação de
vasos sanguíneos em modelos *in vitro* e *in vivo*

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
ÁREA DE BIOTECNOLOGIA

FERNANDA KATHARINE DE SOUZA LINS BORBA

Estudo da atividade dos sulfatos de condroitina e glucosamina na formação de vasos sanguíneos em modelos *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Romildo Albuquerque Nogueira (DMFA/UFRPE)

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Dias (BEG/UFSC)

RECIFE

2012

B726e Borba, Fernanda Katharine de Souza Lins
Estudo da atividade dos sulfatos de condroitina e
glucosamina na formação de vasos sanguíneos em modelos
in vitro e *in vivo* / Fernanda Katharine de Souza Lins Borba.
– Recife, 2012.
186 f. : il.

Orientador: Romildo Albuquerque Nogueira.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia
e Fisiologia Animal, Recife, 2012.
Inclui referências e anexos.

1. Sulfato de condroitina 2. Sulfato de glucosamina
3. Angiogênese 4. Vasculogênese 5. Dimensão fractal
6. Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC)
I. Nogueira, Romildo Albuquerque, orientador II. Título


CDD 636.089

FERNANDA KATHARINE DE SOUZA LINS BORBA

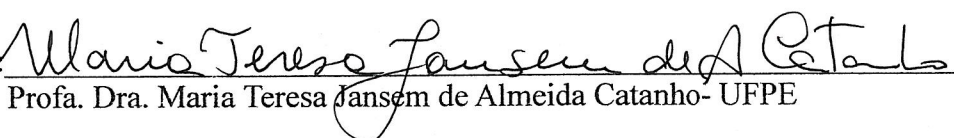
**ESTUDO DA ATIVIDADE DOS SULFATOS DE CONDROITINA E GLUCOSAMINA
NA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS EM MODELO *in vitro* E *in vivo***

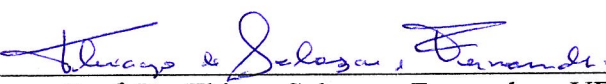
Tese a ser submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

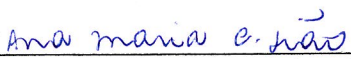
Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2012.

Presidente: 
Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira- UFRPE

Banca Examinadora

1º Examinador: 
Profa. Dra. Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho- UFPE

2º Examinador: 
Prof. Dr. Thiago Salazar e Fernandes - UFPE

3º Examinador: 
Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão - UFRPE

4º Examinador: 
Dr. Bruno Mendes Tenório - UFRPE

Esta Tese foi desenvolvida através do Programa de Pós graduação em Biociência Animal, no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA-UFRPE) de Recife, com auxílio da Bolsa da FACEPE e posteriormente, com Bolsa da CAPES. Parte da pesquisa foi realizada em Florianópolis (Santa Catarina) em convênio com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento no Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA), durante um estágio, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Fernando Dias do Departamento Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (BEG/CCB-UFSC).

À Deus por nunca me desamparar nos momentos
mais difíceis da vida. Conduzir-me com amor e
sabedoria, deixando meu trilhar mais suave nesta
longa jornada da vida.
E aos meus pais, Marília e Fernando, agradeço pelo
imenso apoio, exemplo, força e amor que tornaram
possíveis todas as oportunidades da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Romildo Albuquerque Nogueira por ter me dado à oportunidade, por confiar em mim, e que com dedicação e carinho me transmitiu seus conhecimentos, sua experiência profissional e de vida.

Ao Professor Dr. Paulo Fernando Dias, que me recebeu em seu laboratório (LEBIMA-UFSC), por sua co-orientação, com quem muito aprendi, sua amizade e como exemplo de profissional.

À Professora Dr^a. Ana Maria Carneiro Leão (DMFA - UFRPE), pelos valiosos ensinamentos, amizade, e um exemplo a seguir.

À Professora Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (DMFA – UFRPE), pela amizade e incentivo na minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. George C. Jimenez (DMFA - UFRPE) pela amizade, ensinamentos e incentivo.

Aos demais professores do curso de pós-graduação em Biociência Animal que sempre estiveram prestes a transmitir conhecimentos.

Ao Professor Dr. Marcelo Maraschin (Centro de Ciências Agrárias–CCA/UFSC), pela atenção e importante iniciativa na obtenção das substâncias químicas utilizadas neste estudo, em pedido ao Prof. Dr Henrique Beirão (CCA - UFSC) integrante da empresa Phytomare (SC).

Ao Dr. Wilson Bevilac (Empresa Tyson, SC), pela colaboração e inestimável suporte no fornecimento de material biológico para a pesquisa.

Aos meus queridos amigos do mestrado e doutorado do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, em especial a Flávio e Maria Helena, e aos caríssimos colegas do Laboratório em Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (UFRPE), Edbhergue, Prof^a. Marliete, Jeine, Daniella e Renato, pelo

companheirismo e amizade. Terei sempre ótimas lembranças dos dias que passamos juntos no laboratório.

Aos queridos colegas do LEBIMA-UFSC, Dra. Simone Kobe, Cristiane, Lisiê, Fernanda Berti, Beatriz (“Bia”), Virgílio, Danielle, Susane, e em especial a Lisiê Viviane e Giovanni, pela grande ajuda e amizade. Nunca me esquecerei dos ótimos momentos!

À Luiza e Luís do LEBIMA-UFSC pelo apoio técnico dado.

A CAPES e a FACEPE, pelo incentivo dado a pesquisa através da concessão da bolsa de doutorado.

Aos estimados grandes amigos Gisele, Milena, Camila e Igor, pelo apoio incondicional, companheirismo, paciência e carinho nos momentos difíceis da minha vida.

Aos animais eutanasiados neste estudo, em prol da ciência.

A outros tantos colegas e professores que, apesar de não serem lembrados nesta página, jamais serão esquecidos.

RESUMO

Sulfato de glucosamina (SG) e Sulfato de condroitina (SC) são constituintes funcionais dos tecidos de vertebrados. O SG é um aminoaçúcar e o SC integra o grupo das glicosaminoglicanas (GAG). Estudos apontam propriedades anti-inflamatórias do SC e SG, e demonstram ainda que essas substâncias promovem a cicatrização e a proliferação de fibroblastos, os quais expressam moléculas que atuam na formação de vasos sanguíneos (angiogênese). Os objetivos deste estudo foram avaliar a ação do SC e SG em modelos *in vitro* sobre a viabilidade (citotoxicidade pelo MTT), proliferação (incorporação por BrdU) e diferenciação (tubulogênese em suporte matrigel) na linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Também se investigou a angiogênese *in vivo*: (1) em membranas anexas de embriões de *Gallus domesticus* (número de vasos corioalantóides - ensaio da CAM, e vitelínicos – ensaio da YSM; e análise por geometria fractal); (2) e no tecido subcutâneo de camundongos adultos por meio de quantificação da hemoglobina em implantes de Gelfoam. No ensaio com HUVEC, SC e SG (1-3000 µg/mL) exerceram efeito citotóxico parcial (~50% de viabilidade), e somente nas respectivas maiores concentrações (3000 e 1000 µg/mL). Verificou-se que o SC (3 µg/mL), mas não o SG, estimulou a proliferação e a tubulogênese de HUVEC em 40% ($p < 0,05$) e em 64% ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao controle (meio RPMI-1640). Estes efeitos não diferiram estatisticamente dos 28% e 53%, respectivamente, promovidos pelo bem conhecido fator de crescimento angiogênico FGF-2 (50 ng/mL). No ensaio de vasculo-angiogênese na YSM de embriões de 2-4 dias de idade o SG (0,001-0,1mg/disco) principalmente, e o SC (0,030-0,1mg/disco) aumentaram o número de vasos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os efeitos da administração de SC e SG (0,1 mg/disco) não diferiram do observado no grupo tratado com 50 ng/mL de FGF-2. No ensaio de angiogênese na CAM de embriões de 6-8 dias de idade, ambos, SC e SG também elevaram o número de vasos em relação ao controle na concentração elevada de 2,0 mg/disco. Este efeito também não diferiu do observado no grupo exposto a 50 ng/mL de FGF-2. O efeito pró-angiogênico do SC (2 mg/disco) na angiogênese embrionária foi confirmado na angiogênese avançada de camundongos adultos. Apenas o grupo que recebeu SC (2 mg/implante) mostrou um aumento significativo de vasos

sanguíneos, expresso como conteúdo de hemoglobina ($0,52 \pm 0,08$ g/dL), comparado ao controle (veículo; PBS; $0,20 \pm 0,07$ g/dL). Este efeito pró-angiogênico não diferiu do obtido com FGF2 ($0,53 \pm 0,1$ g/dL). Os resultados *in vitro* e *in vivo* demonstram as propriedades pró-angiogênicas do SC e SG, contudo o SC (GAG) foi o mais efetivo nos ensaios. Como um constituinte de proteoglicanas, o SC sugere exercer seus efeitos pela interação com o FGF e outros fatores angiogênicos na matriz extracelular, estabilizando-os nos receptores e modulando assim, positivamente, o sinal pró-angiogênico nas células endoteliais. Embora mecanismos celulares subjacentes à atividade de SC e SG demandem mais estudos, evidencia-se um potencial papel terapêutico das duas substâncias em situações clínicas relacionadas à defasagem vascular.

Palavras-chave: Sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina, angiogênese, vasculogênese, dimensão fractal, células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC)

ABSTRACT

Chondroitin Sulfate (CS) and Glucosamine Sulfate (GS) are functional constituents of vertebrate tissues. GS is an amino sugar and CS is part of the glucosaminoglycans group (GAGs). Studies have suggested CS and GS to have anti-inflammatory properties, however it has also been shown that these compounds promote scarring and proliferation of fibroblasts, which express molecules important for blood vessel growth (angiogenesis). This study was aimed at evaluating the effects of CS and GS on *in vitro* models regarding cell viability (cytotoxicity - MTT), proliferation (BrdU incorporation) and differentiation (tubulogenesis in Matrigel support) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC line). *In vivo* angiogenesis was also evaluated in (1) extraembryonic membranes of *Gallus domesticus* (number of chorioallantoic vessels - CAM assay and vitelinic YSM assay; and fractal geometry analysis); (2) and subcutaneous tissue of adult mice (*Mus musculus*) by hemoglobin quantification (Spectroscopy) in Gelfoam implants. In the HUVEC assay, both CS and GS (1-3000 $\mu\text{g/mL}$) displayed partial cytotoxic effect (~50% viability), but only in the highest tested concentrations (3000 and 1000 $\mu\text{g/mL}$). It was observed that CS (3 $\mu\text{g/mL}$), but not GS, promoted proliferation and tubulogenesis of HUVEC in 40% ($P < 0.05$) and 64% ($P < 0.05$), respectively, relative to control (RPMI-1640 medium). These effects did not significantly differ from the respective 28% and 53% promoted by the well known angiogenic growth factor FGF-2 (50 ng/mL). In the *in vivo* vasculo-angiogenesis YSM assay on 2 to 4-day old embryos, GS (0.001-0.1mg/disk) and, to a lesser extent, CS (0.030-0.1mg/disk) increased the amount of vessels relative to control ($P < 0.05$). The effects of administration of CS and GS (0.1mg/disk) did not differ from what was observed in groups treated with 50 ng/mL FGF2. In the CAM angiogenesis assay on 6 to 8-days old embryos, again both CS and GS increased the amount of vessels relative to control, but only in concentrations as high as 2.0 mg/disk. This effect was no different from what was observed in groups treated with 50 ng/mL FGF2. The pro-angiogenic effects of CS (2 mg/disk) in embryony angiogenesis were confirmed in the advanced angiogenesis of mice: only the group treated with CS (2 mg/implant) displayed a significant increase in the amount of blood vessels, expressed as hemoglobin content ($0.52 \pm 0.08\text{g/dL}$), relative to control (vehicle; PBS; $0.20 \pm 0.07\text{g/dL}$). This pro-angiogenic effect was no different than that

of FGF2 ($0.53 \pm 0.1\text{g/dL}$). The *in vitro* and *in vivo* results indicate the pro-angiogenic properties of CS and GS. However, CS (GAG) was the more effective compound in the tests performed. As a constituent of proteoglycans, it is suggested that CS exerts its effects by interacting with FGF and other angiogenic factors in the extracellular matrix, stabilizing the receptor, and thus positively modulating the pro-angiogenic signal in endothelial cells. While the cellular mechanisms underlying CS and GS activity demand more specific research, there is an evident potential therapeutic use for both compounds in clinical situations, such as those related to vascular discrepancy.

Keywords: Chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, angiogenesis, vasculogenesis, fractal dimension, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUÇÃO	18
1.1 Formação de vasos sanguíneos.....	18
1.2 Regulação da formação de vasos sanguíneos: inibidores e ativadores..	20
1.3 Angiogênese terapêutica.....	27
1.4 Algumas características químicas e funcionais dos sulfatos de condroitina e glucosamina	29
1.5 Geometria fractal aplicada na rede vascular.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1- Objetivo geral.....	35
2.2 – Objetivos específicos.....	35
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4. CAPÍTULO I	50
Resumo.....	51
Introdução.....	52
Materiais e métodos.....	54
Resultados.....	58
Discussão.....	60
Conclusão.....	63
Referência Bibliográfica.....	64
5. CAPÍTULO II	73
Resumo.....	74
Introdução.....	76
Materiais e métodos.....	79
Resultados.....	86
Discussão.....	90
Conclusão.....	94
Referência Bibliográfica.....	95
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106

7. ANEXOS..... 108

Anexo 1: Artigo - Angiogenic properties of glucosamine and chondroitin sulfates: An *in vivo* study by fractal analysis..... 109

Anexo 2: Artigo - Pro-Angiogenic properties of chondroitin sulfate and glucosamine sulfate: a comparative study *in vitro* and *in vivo*..... 143

Anexo 3: Certificado de análise do sulfato de condroitina e do sulfato de glicosamina.....187

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Processo de formação de novos capilares sanguíneos por angiogênese 19
- Figura 2.** Representação esquemática de um modelo de regulação do fator de crescimento de fibroblastos – tipo básico (FGF2). 24
- Figura 3.** Estrutura química do sulfato de glucosamina (glucosamina-6-sulfato). 31
- Figura 4.** Unidades de dissacarídeo do sulfato de condroitina 4 e sulfato de condroitina 6. 32
- Tabela 1.** Ativadores e inibidores da formação de vasos sanguíneos. 21

CAPITULO I

- Figura 1.** Imagens eskeletonizadas da rede vascular da YSM após o implante dos discos de metilcelulose contendo diferentes concentrações de SC (0,001 – 0,03 mg/disco). 69
- Figura 2.** Efeito estimulatório do SC (0.001-0.1 mg/disco) na vascularização da YSM no 4º dia. Os resultados foram quantificados, por imagens eskeletonizadas, das dimensões fractais de *Box-counting* (D_{BC}) e de informação (D_{INF}). 70
- Figura 3.** Imagens eskeletonizadas da rede vascular da YSM após o implante dos discos de metilcelulose contendo diferentes concentrações de SG (0,001 – 0,03 mg/disco). 71
- Figura 4.** Efeito estimulatório do SG (0.001-0.1 mg/disco) na vascularização da YSM no 4º dia. Os resultados foram quantificados, por imagens eskeletonizadas, das dimensões fractais de *Box-counting* (D_{BC}) e de informação (D_{INF}). 72

CAPITULO II

- Figura 1.** Efeito do SC, SG isoladamente (1-3000 μ g/poço) e em associação na viabilidade de células da linhagem HUVEC. 100
- Figura 2.** Efeito do SC e SG (3, 30 e 300 μ g/poço), na presença e ausência do FGF2 (50 ng/poço) na proliferação de células HUVEC avaliadas pela técnica de BrdU. 101
- Figura 3.** Efeito do SC e SG (3, 30 e 300 μ g/poço), na presença e 102

ausência do FGF2 (50 ng/poço) na formação de túbulos vasculares por HUVEC em suporte Matrigel.

Figura 4. Efeito estimulatório do SC (0,2 - 2 mg/disk) na vascularização da CAM no 8º dia. O resultado foi quantificado, por imagens esqueletronizadas, por dimensão de *Box-counting* (D_{BC}). 103

Figura 5. Efeito estimulatório do SG (0,2 - 2 mg/disk) na vascularização da CAM no 8º dia. O resultado foi quantificado, por imagens esqueletronizadas, por dimensão de *Box-counting* (D_{BC}). 104

Figura 6. Efeito do SC ou SG (2 mg/animal) e combinado ao FGF2 (50 ng/animal) em plugs de gelfoam implantados (s.c.) em camundongos, espécie *M. musculus*, adultos, com base no conteúdo de hemoglobina existente no gelfoam (570 nm). 105

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang = angiopoietina

BrdU = 5-bromo-2'-desoxi-uridina

CAM = membrana corioalantóide

CEP = células precursoras endoteliais

COX-2 = ciclooxigenase-2

CSPG = proteoglicana sulfato de condroitina

D_{BC} = dimensão de *box-counting*

D_{INF} = dimensão de informação

DAPI = 4',6 - diamidino-2- fenil-indol

DMSO = dimetilsufóxido

EDTA = ácido etilenodiaminoteracético

EGF = Fator de Crescimento Epidermal

FBS = soro fetal bovino

FGF-1 = fator de crescimento de fibroblastos 1

FGF-2 = fator de crescimento de fibroblastos 2

FGFR = receptor do FGF

GAG = glicosaminoglicano

HUVEC = célula endotelial da veia umbilical humana

HS = sulfato de heparana

HBGF = fatores de crescimento ligantes de heparina

HSPG = proteoglicana sulfato de heparana

IGF = Fator de crescimento da insulina

MC = discos de metilcelulose

MEC = matriz extracelular

MMPs = metaloproteinases da matriz

MTT = 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio

PBS = Tampão fosfato-salino

PG = proteoglicana

PLGF = Fator de crescimento plaquetário

RPMI-1640 = meio de cultura de células Roosevelt Park Memorial Institute – 1640

SC = sulfato de condroitina

SG = sulfato de glucosamina

TNF- α = fator de necrose tumoral – tipo alfa

VEGF = fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR = resceptores de VEGF

YSM = membrana do saco vitelinico

1. INTRODUÇÃO

1.1 Formação de vasos sanguíneos

O desenvolvimento e o funcionamento adequado dos tecidos dependem de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune. Esse suprimento é fornecido através dos vasos sanguíneos (RISAU, 1997).

A formação dos vasos sanguíneos ocorre em resposta a fatores de crescimento ou sinais específicos, que determinam a diferenciação de células endoteliais (que delimitam o interior dos vasos) e de células musculares lisas (que os revestem externamente) e a organização do conjunto dessas células em forma de 'tubos'. Os vasos sanguíneos são, portanto, estruturas tubulares organizadas a partir de uma camada única de células endoteliais interconectadas e revestidas pela matriz extracelular (trama tridimensional constituída de macromoléculas como colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas) e por camadas de células com função de suporte. Essa estrutura tubular é responsável pelo fluxo do sangue por todo o corpo e os nutrientes e resíduos passam através de suas paredes para os tecidos ou destes para o sangue (perfusão tecidual) (TOBELEM, 1990; YANCOPOULUS *et al.*, 2000).

O processo de surgimento dos vasos sanguíneos ocorre principalmente por dois diferentes mecanismos, a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é um processo definido como o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir da proliferação *in situ* de células mesodérmicas progenitoras de células endoteliais (angioblastos e hemangioblastos) (RISAU *et al.*, 1988). Estas células precursoras são recrutadas de áreas de mesoderma adjacentes ao embrião e/ou originadas por divisão celular local, organizando ilhotas sanguíneas e estabelecendo um plexo vascular primário. Com o tempo, esses canais endoteliais vão se desenvolvendo formando um sistema mais complexo e se ramificando em vasos maiores e menores (RUITER *et al.*, 1992; RISAU; FLAMME, 1995; AUERBACH; AUERBACH, 2002).

No decorrer do desenvolvimento embrionário o sistema cardiovascular é o primeiro sistema estabelecido, formado a partir da camada germinativa intermediária do embrião, o mesoderma. Esse sistema compõe-se do coração, vasos sanguíneos

(artérias, veias e capilares) e vasos linfáticos (JONES *et al.*, 2001; BRADE; MANNER; KUHL, 2006).

Durante a embriogênese inicial, a vascularização necessária para o desenvolvimento do coração e dos grandes vasos ocorre por vasculogênese. Posteriormente através da angiogênese, a rede de vasos primários sofre remodelagem, combinando eventos de morte e regressão vascular com a sobrevivência e ramificação de capilares a partir de vasos pré-existentes, os quais proliferam para viabilizar o crescimento e desenvolvimento de órgãos (cérebro, pulmões e fígado) que requerem invasão de vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1971; RISAU *et al.*, 1988; RISAU, 1997). O processo de angiogênese (Figura 1) ocorre a partir de diversos eventos nos quais estão envolvidos diferentes mecanismos celulares, como a degradação da matriz extracelular, migração e proliferação de células endoteliais, além do alinhamento e organização destas células para formação de tubo vascular (tubulogênese) (BISCHOFF, 1995; CARMELIET, 2003; FISCHER; SCHNEIDER; CARMELIET, 2006; PERSSON; BUSCHMANN, 2011).

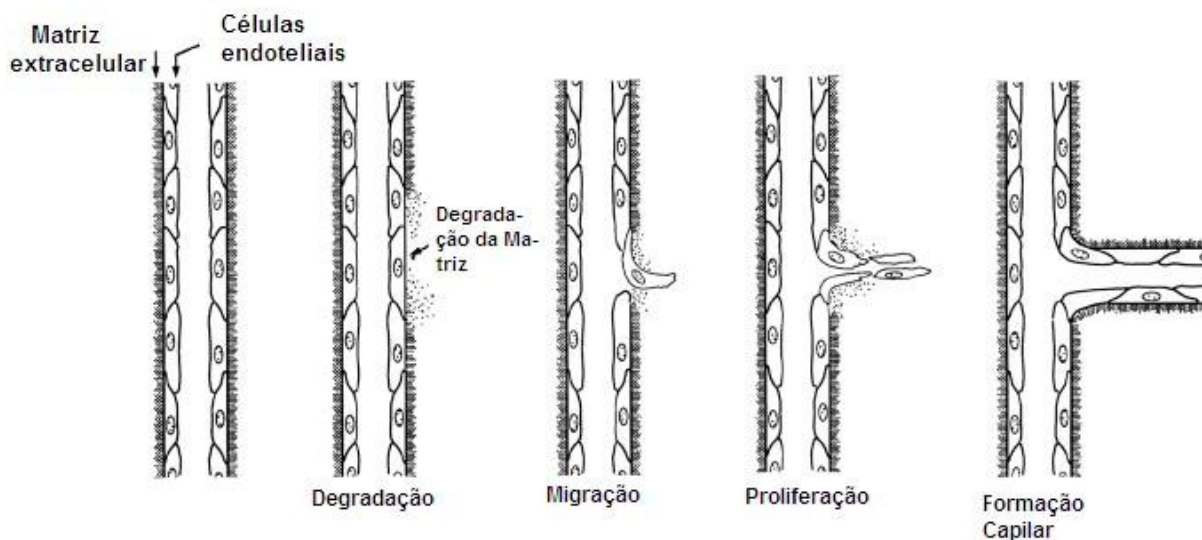


Figura 1. Processo de formação de novos capilares sanguíneos por angiogênese (Adaptado de BISCHOFF, 1995).

No organismo adulto, a formação de vasos sanguíneos é mantida sob rígido controle, sendo a angiogênese desprezível após ter sido alcançada essa fase da vida (FOLKMAN, 1971; FOLKMAN; SHING, 1992). Porém, esse processo ainda continua desempenhando no adulto um papel fundamental em inúmeros processos

fisiológicos, por exemplo, na cicatrização de feridas, regeneração de órgãos e no ciclo reprodutivo feminino (FOLKMAN *et al.*, 1988; BERGERS; BENJAMIN, 2003).

No entanto de acordo com algumas evidências, o crescimento e a neoformação vascular (neovascularização), em adultos, também ocorrem através dos processos de vasculogênese, a qual não está restrita apenas a embriogênese. Estudos mostram que células precursoras endoteliais (CEP) presentes na medula óssea, bem como na circulação sanguínea possuem funções semelhantes aos angioblastos embrionários. Este fato sugere que as CEP possam estimular a formação de novos vasos em adultos seja em condições fisiológicas ou patológicas, este processo é semelhante ao que ocorre na vasculogênese embrionária (RIBATTI *et al.*, 2001; ZAMMARETTIA; ZISCHIA, 2005; CABALLERO *et al.*, 2007; PÉAULT, 2010). De acordo com Caballero *et al.* (2007), em condições de hipóxia/isquemia na retina em adultos, ocorre o estímulo à neovascularização por meio da mobilização de CEP da medula óssea e proliferação de células endoteliais locais (angiogênese). Outra evidência é que uma função deficiente das CEP pode ser uma das responsáveis por um aumento da vasculogênese, bem como da angiogênese, na artrite reumatoide, osteoartrite (RUGER *et al.*, 2004; SZEKANECZ *et al.*, 2010) e na vascularização de tumores (PATENAUDE; PARKER; KARSAN, 2010).

Dessa forma, erros na regulação da formação de vasos sanguíneos levam ao desenvolvimento de certas patologias (FOLKMAN, 2006), tais como condições inflamatórias sistêmicas (endometriose, psoríase e artrite reumatóide), doenças oculares (retinopatia diabética proliferativa, retinopatia de prematuridade, degeneração macular relacionada a idade), arteriosclerose, isquemia miocárdica, crescimento tumoral e metástase. A angiogênese patológica é o resultado da quebra do balanço homeostático que se baseia no equilíbrio entre inibidores e ativadores da angiogênese. (FOLKMAN *et al.*, 1988; SCHWARTZ *et al.*, 2008; MELO-REIS *et al.*, 2010; PERSSON; BUSCHMANN, 2011).

1.2 Regulação da formação de vasos sanguíneos: inibidores e ativadores

Desde o importante artigo publicado por FOLKMAN (1971), vários estudos têm abordado os reguladores envolvidos na formação de vasos sanguíneos

demonstrando que a manutenção do sistema vascular é baseada na coexistência de sinais angiogênicos (ativadores) e angiostáticos (inibidores) (ver Tabela 1) em um equilíbrio dinâmico de concentrações estritamente controladas, mas que pode ser rapidamente estimulado ou inibido (BERGERS; BENJAMIN, 2003; FERARRA; KERBEL, 2005; TUETEMBERG *et al.*, 2006; MUNDEL; KALLURI, 2007).

Tabela 1. Ativadores e inibidores da formação de vasos sanguíneos

Ativadores	Inibidores
Fator de Crescimento Endotelial Vascular(VEGF)	Trombospondina
Fator de crescimento de fibroblastos - básico (FGF2)	Angiostatina
Metalloproteinase da matriz(MMP)	Endostatina
Angiopietina (Ang)	
Angiogenina	Canstatina
Fator de crescimento plaquetário (PLGF)	
Timidinafosforilase	Condromobulina-1
Angiogenina	Heparinases
Ciclooxigenase2 (COX 2)	Fator derivado do epitélio pigmentado
Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF)	Ácido retinóico
Fator de crescimento transformante (TGF-β)	Retinoides
Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)	Interferon-γ
Integrinas	Fator derivado do epitélio pigmentado
Interleucinas: IL -1α e IL-8	Troponina – derivada da cartilagem
Molécula de Adesão Celular Plaqueta-Endotelio (PECAM-1)	Interleucina: IL-4, IL-12

Fonte: BHADADA; GOYAL; PATEL, 2011

A maioria das moléculas angiogênicas (ativadoras) são proteínas, sendo em sua maior parte fatores de crescimento que induzem as células endoteliais a se dividir, migrar em direção ao indutor do estímulo, e diferenciar-se em estruturas tubulares (tubulogênese). Estas moléculas são secretadas por um grande número de

células, principalmente células endoteliais, em resposta à estímulos exógenos ou endógenos e são produzidos localmente, de uma maneira autócrina e/ou parácrina. Esses mediadores podem estimular a angiogênese diretamente através da interação com os receptores na superfície da célula endotelial, ou indiretamente, pela atração e ativação de células acessórias, tal como macrófagos, levando-os a produzir mediadores angiogênicos. Outras substâncias desempenham um papel importante na estabilização e melhoria da função das moléculas angiogênicas (ativadoras), normalmente sequestradas na matriz extracelular, como exemplo a heparina, que quando ligado ao FGF2 facilita a sua interação com seus receptores de alta afinidade na superfície da célula endotelial (POLVERINI,1995; NUGGENT; IOZZO, 2000; BHADADA; GOYAL; PATEL, 2011).

Entretanto, algumas moléculas biológicas que atuam diretamente sobre as células endoteliais bloqueando a sua migração, proliferação e /ou a sua capacidade para formar estruturas tubulares são denominados inibidores da formação de vasos sanguíneos (KLAGSBRUN; MOSES, 1999). São reconhecidas ao menos duas barreiras de defesa molecular de origem endógena contra a angiogênese excessiva (patológica): (I) Inibidores da angiogênese na matriz extracelular, tais como tetrahydrocortisol, o fator plaquetário 4, angiostatina, e endostatina; (II) e inibidores da angiogênese expresso por células normais, mas desregulado em células tumorais, tal como a trombospondina (FOLKMAN, 2003).

Os processos de angiogênese e vasculogênese são regulados de maneira distinta (RISAU *et al.*, 1988). Entretanto, de acordo com Rafii e Lyden (2003), Bergers e Benjamim (2003), Duan; Nagy; Fong (2003) fatores que estimulam a angiogênese, tais como VEGF, PLGF, Ang (Tabela 1) são conhecidos também por estimular o processo de vasculogênese.

Dentre os fatores ativadores da angiogênese, o FGF foi o primeiro fator a ser purificado. Ele foi descoberto em 1984 por Shing *et al.* (1984), que curiosamente verificou que esta proteína possuía uma grande afinidade pela heparina e estimulava a proliferação de células endoteliais vasculares. Existem 24 membros pertencentes à família do FGF (ITOH; ORNITZ, 2004), contudo FGF1 e FGF2 (FGF ácido - FGFa e FGF básico - FGFb, respectivamente) são os elementos melhor estudados.

O FGF2 foi o primeiro membro da grande família do FGF a ser descrito, e está envolvido numa etapa muito importante da angiogênese que inclui a proliferação, migração e a diferenciação em estruturas tubulares de células endoteliais (ORNITZ; ITOH, 2001; PRESTA *et al.*, 2005). Este fator de crescimento em conjunto com a heparina (glicosaminoglicano) ou com a proteoglicana sulfato de heparana (HSPG) medeiam uma grande variedade de respostas celulares através da ligação e ativação do receptor de tirosina-quinase, no caso, o receptor para receptores do FGF (FGFR) (YAYON *et al.*, 1991; NUGGENT; IOZZO, 2000; PRESTA *et al.*, 2005).

As associações entre HSPGs e as células podem existir tanto como moléculas de HSPGs intercaladas na membrana (sindecana e glipicana) como HSPGs ligadas firmemente à matriz (perlecana e agrina) (Figura 2). Segundo esses autores, a intensidade da resposta celular irá depender da capacidade de formarem complexos entre o receptor do FGF2 (FGFr) e HSPGs binários ou terciários; estes últimos, de alta afinidade e menor constante de dissociação (NUGENT; IOZZO, 2000).

Alguns autores demonstram que o FGF2 estimula células endoteliais a produzir metaloproteinases da matriz (MMPs), resultando na degradação da matriz extracelular e estimulando a migração de células endoteliais, promove um aumento na secreção do VEGF e expressão do VEGFR, o que atrai pericitos e favorece deposição da matriz (PRESTA *et al.*, 2005). A administração tópica deste fator de crescimento em um modelo em orelha de coelhos induziu uma grande vascularização na área, apesar de alguns animais apresentarem sangramento (KOMORI *et al.*, 2005). Ensaio realizados por Sahni *et al.* (2006), com vasos da placenta, da membrana corioalantóide (CAM) de embrião de galinha e no modelo de implante de matrigel em camundongos, mostraram que o FGF2 em presença de fibrina/fibrinogênio promovia maior crescimento de novos vasos sanguíneos, indicando que a capacidade deste fator de crescimento para se ligar a fibrina é essencial para formação de estruturas vasculares na matriz de fibrina.

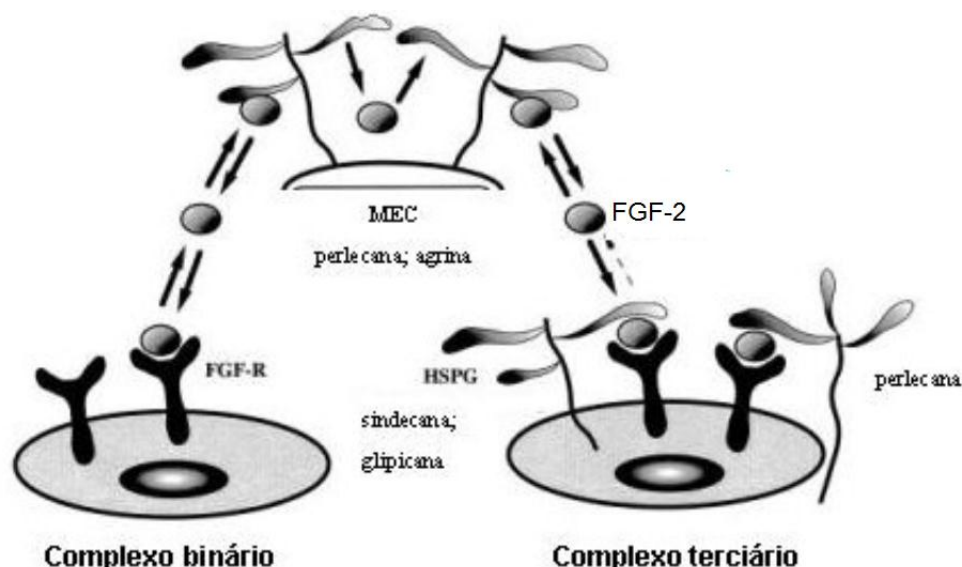


Figura 2 - Modelo de regulação do FGF2. HSPGs de matriz extracelular ligam-se rapidamente ao FGF2, com cinética reversível, mantendo um importante estoque dessas moléculas em estado ativo. A densidade de HSPGs na matriz determinará as taxas de liberação e de transporte de FGF2. A natureza protéica do núcleo das proteoglicanas (PG), bem como a estrutura do sulfato de heparana, podem desencadear respostas celulares qualitativamente diferentes. As funções exatas dessas PG específicas não são conhecidas e, provavelmente, não são restritas àquelas descritas no esquema (adaptado de NUGGENT; IOZZO, 2000).

Outro fator de crescimento muito estudado é o VEGF, inicialmente denominado fator de permeabilidade vascular. Seu isolamento e sequenciamento foram realizados por Ferrara e Henzel (1989). Nos últimos anos, cinco membros da família VEGF vêm sendo identificados, incluindo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (YANCOPOULOS, 2000; BHADADA; GOYAL; PATEL, 2011). Os receptores de VEGFs – designados atualmente como VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR ou Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4) – assim como o FGF - estão relacionados à atividade da enzima tirosina quinase, uma classe de receptores que forma dímeros em resposta à ligação dos sinais angiogênicos. O VEGFR-2 é o maior responsável pelos efeitos do VEGF-A sobre as células e é indispensável no desenvolvimento vascular. A sua ativação efetua um papel importante na mediação do crescimento de vasos sanguíneos, estimulando a proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação (túbulos vasculares) de células endoteliais. Enquanto o VEGFR-1

exerceria uma ação antagonista, ligando-se ao VEGF-A sem efetivar qualquer resposta positiva sobre a vascularização (MANOLOPOULOS *et al.*, 2000; SHIBUYA; CLAESSION-WELSH, 2006).

De acordo com a literatura a inativação de apenas um alelo do VEGF-A provoca uma má-formação nos vasos sanguíneos em embriões de ratos e conduz à letalidade no estágio embrionário E. 9.5 (CARMELIET *et al.*, 1996; FERRARA *et al.*, 1996). Por outro lado, a expressão elevada de VEGF-A resulta em anomalias graves no desenvolvimento do coração e também conduz a letalidade embrionária em ratos nos estágios E12.5 e E14 (MIQUEROL; LANGILLE; NAGY, 2000). Sendo assim, os níveis de VEGF-A devem ser rigorosamente controlados para que os processos de vasculogênese e angiogênese ocorram normalmente. Por conta disso, nos últimos anos estudos tem focado na expressão do VEGF-A e do seu receptor VEGFR-2 em condições normais e patológicas (DVORAK, 2006; MUKHOPADHYAY; ZENG; BHATTACHARYA, 2004; OLSSON *et al.*, 2006).

Logo após a descoberta do VEGF-A foi identificado outro fator específico para o endotélio vascular, denominado Angiopietina (Ang). Este fator de crescimento pertence a uma família de ligantes compreendendo quatro membros (Ang 1, Ang 2, Ang 3 e Ang 4) (DAVIS *et al.*, 1996). Destes, Ang1 e Ang2 são mais conhecidos no que diz respeito às suas funções na angiogênese normal e patológica. Embora estas duas moléculas possam ligar-se ao receptor de tirosina quinase Tie2 com afinidade semelhante, Ang2 pode inibir Ang1 sob um determinado contexto fisiológico (MAISONPIERRE *et al.*, 1997). Em adultos, Ang1 é um fator de anti-permeabilidade protegendo contra o excessivo extravasamento de plasma, uma vez que contribui para a estabilização de vasos preexistentes ou maturação de vasos recém-formados através do recrutamento de pericitos e células musculares lisas (THURSTON *et al.*, 2000). Por outro lado, Ang2 pode estar envolvido na regressão ou na formação de novos vasos sanguíneos, dependendo do contexto, uma vez que este fator angiogênico tem a capacidade de bloquear seu receptor (Tie2), promovendo tanto a regressão como a formação de vasos dependendo da ausência ou presença de VEGF. Assim, Ang2 é preferencialmente expresso em locais de remodelação angiogênica ou vascular, que pode possibilitar a migração e proliferação de células endoteliais, mas também a sua regressão ao manter as células em uma condição de

instabilidade frente a fatores antiangiogênicos (MAISONPIERRE *et al.*, 1997; OH *et al.*, 1999; FISCHER; SCHNEIDER; CARMELIET, 2006).

Outras moléculas envolvidas durante o processo de formação de vasos sanguíneos são as que estão relacionadas a interação célula-célula e célula com a matriz extracelular (MEC). Os vasos recém-formados pela síntese de uma nova membrana basal e por pericitos e células musculares lisas envolve tanto modificações na adesão destas células quanto da célula endotelial (SILVA *et al.*, 2008). A adesão celular envolve a participação de moléculas como integrinas, caderinas e selectinas (WAGENER; ERGÜN, 2000). As integrinas são glicoproteínas transmembrana, que promovem a adesão e migração pela MEC de células endoteliais (CHRISTIE *et al.*, 2008). As moléculas de caderinas vasculares endoteliais, localizadas em junções aderentes, constituem uma barreira entre células endoteliais vizinhas, mediada por interações dependentes de cálcio e estão conectadas a um conjunto de proteínas ligadas ao citoesqueleto, como cateninas, α -actinina e vinculina (BLASCHUK; ROWLANDS, 2000). A selectina é composta por L-selectina, E-selectina e P-selectina, sendo esta última expressa na superfície do endotélio quando estimulada por citocinas inflamatórias (TNF- α , interleucina-1 e 10) (NASTRI *et al.*, 2008). Estudos mostram que a E-selectina solúvel induz angiogênese em córnea de rato e estimula a quimiotaxia e formação de microvasos de células endoteliais da derme humana (OH *et al.*, 2007).

Na ausência de contatos com células perivasculares (presentes na parede vascular) e com a matriz extracelular, os vasos sanguíneos tornam-se susceptíveis à regressão via apoptose (indução de morte celular, em razão da perda de adesão celular ao suporte na matriz extracelular) (MELINO, 2001). Embora a supressão da apoptose em células endoteliais seja necessária para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos e para a angiogênese, a ativação da apoptose é importante por contribuir na destruição dos tecidos danificados durante a, inflamação e a aterosclerose (WILLIAMS *et al.*, 2006).

Alguns dos inibidores endógenos da formação de vasos sanguíneos, presentes no Tabela 1, incluem metabolitos hormonais e moduladores da apoptose (FOLKMAN, 1995). Curiosamente muitas moléculas inibidoras, tais como as estatinas (lipoproteínas), são derivadas de proteínas maiores que não possuem esse

efeito na angiogênese (NYBERG; XIE; KALLURI, 2005). Dentre aquelas, destaca-se a angiostatina (O'REILLY *et al.*, 1994), um fragmento de plasminogênio que se liga diretamente à adenosina trifosfato sintase na superfície das células endoteliais, desempenhando um papel na acidificação intracelular desencadeando eventos apoptóticos nas células endoteliais (MOSER *et al.*, 1999). Outras proteínas anti-angiogênicas resultantes da proteólise de moléculas maiores são a endostatina (um fragmento de colágeno XVIII) (O'REILLY *et al.*, 1997; STANDKER *et al.*, 1997), tumistatina (MAESHIMA; COLORADO; KALLURI, 2000), e canstatina (fragmentos de colágenos que se ligam a integrinas) (KAMPHAUS *et al.*, 2000). Algumas proteínas não-fragmentadas também exibem atividade anti-angiogênica. Dentre elas estão trombospondina-1, -2 e -3 produzido por fibroblastos (GOOD *et al.*, 1990); interferon α , expresso em leucócitos (RIBATTI *et al.*, 1996); e o fator 4 plaquetário (MAIONE *et al.*, 1990).

A necessidade da compreensão dos mecanismos fisiológicos fundamentais no desenvolvimento e surgimento de vasos sanguíneos levou à descoberta de vários fatores de crescimento (estimuladores e inibidores), como descrito anteriormente (Tabela 1). Dessa forma, novas informações obtidas através da identificação de fatores químicos que estimulam ou inibem a formação de vasos sanguíneos, tem sido muito importante na compreensão dos processos patológicos, relacionados principalmente a neoplasias e isquemia. As pesquisas clínicas, relacionadas à angiogênese, tem tomado três direções: Quantificação da angiogênese para o diagnóstico e prognóstico de doenças, estímulo da angiogênese durante o processo de reparação/isquemia (angiogênese terapêutica), e a inibição da angiogênese em vários distúrbios (terapia anti-angiogênica). No entanto, os desafios ainda persistem na tentativa da compreensão de como os fatores angiogênicos ou a sua combinação possam ser utilizados no tratamento dos estados patológicos.

1.3 Angiogênese terapêutica

O desequilíbrio na regulação entre fatores pró-angiogênicos (ativadores) e antiangiogênicos (inibidores) está relacionado com o desencadeamento de enfermidades, como dito anteriormente. A expansão do sistema vascular de uma forma descontrolada é um evento crucial em processos fisiopatológicos como a

oncogênese/metástase de tumores, assim como, em inúmeros processos não-neoplásicos, tal como em distúrbios inflamatórios, a exemplo de endometriose, retinopatia diabética, psoríase e artrite reumatóide, descritos anteriormente (FOLKMAN, 1971; CARMELIET, 2003). Por outro lado, um crescimento ineficiente de vasos ou a sua regressão, não apenas causa isquemia no coração e no cérebro, mas também pode levar a neurodegeneração, hipertensão, insuficiência respiratória, osteoporose, entre outros distúrbios (BHADADA *et al.*, 2011).

A eficácia terapêutica no tratamento de algumas enfermidades relacionadas a angiogênese foi iniciada por FOLKMAN *et al.* (1971), com o estudo no uso de vários fatores de crescimento, mostrando que o crescimento de vários tumores depende da formação de novos vasos para sua nutrição, processo denominado de neovascularização, a qual é mediada por fatores de crescimento angiogênicos específicos em cada neoplasia. Em seguida, a viabilidade na utilização de fatores de crescimento recombinantes angiogênicos para aumentar o crescimento das artérias colaterais foi confirmada em modelos animais de infarto do miocárdio e/ou em isquemia dos membros posteriores (YANAGISAWA-MIWA *et al.*, 1992). Esta nova estratégia para o tratamento de insuficiência vascular foi mais tarde denominado de angiogênese terapêutica e vem sendo discutida em vários artigos (TAKESHITA *et al.*, 1994; MUROHARA, 2003; SABTI, 2007; CAO, 2010).

A terapêutica para promover angiogênese é o oposto da anti-angiogênica, que utiliza substâncias no combate a fatores que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos, e que podem nutrir tumores, fazendo-os crescer. Com a inibição do suprimento vascular do tumor, estes tendem a regredir e o câncer pode continuar a ser tratado (CAO, 2010).

Por outro lado, tratamentos que induzam o surgimento de novos vasos sanguíneos são muito importantes para os pacientes que desenvolveram quadros de isquemia ou insuficiência vascular e que por algum motivo não são passíveis de revascularização. Esta forma de tratamento (pró-angiogênese) é uma alternativa, por exemplo, aos tratamentos cirúrgicos de intervenção percutânea coronariana ou de revascularização, que implicam em maiores riscos ao paciente. Uma suposta “substância ideal” para a angiogênese terapêutica deve exercer uma grande atividade, com benefício clínico sustentado. Além disso, deve ser específica para o

tecido isquêmico a ser tratado. É preciso ainda, levar em conta desde a capacidade de readministração até uma maneira não-invasiva de administrar o medicamento (BRINDLE; MCCARTH; BELL, 1999; SABTI, 2007).

Várias substâncias têm sido usadas na indução e ou manutenção da angiogênese, tais como: o VEGF, FGF, IGF, TNF, o Fator de Crescimento da Célula Endotelial derivado de Plaquetas (PD-ECGF), o fator de crescimento placentário, o fator de crescimento do hepatócito, além de EGF, glicosaminoglicanas (GAG) e diversas moléculas de baixo peso molecular, como angiopoitina, butinil-glicerol, prostaglandinas E1 e E2, nicotinamida, adenosina, leptina, proliferina, tirosina, interleucina 8, produtos do ácido hialurônico e ácido hidroxucosatrínico (ISNER & ASAHARA, 1999; EMANUELI; MADEDDU, 2001; CHIPPERFIELD *et al.*, 2002; ABO-AUDA; BENZA, 2003; NESSA *et al.*, 2009). A limitação do uso farmacológico sustentado ou continuado de tais drogas está relacionada com o tipo de resposta ao estímulo angiogênico artificial, pois há uma tendência natural para regressão do processo (autoregulação), antes que ocorra uma remodelagem vascular, o que permite concluir a maturação dos vasos sanguíneos e estes se tornem estáveis (CLOVER; MCCARTHY, 2003; CAO *et al.*, 2010).

Entre as substâncias utilizadas para promover a angiogênese estão também o sulfato de heparana (FUSTER; WANG, 2010) e a heparina (ROSENGART *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2010), glicosaminoglicanas que orientam a ligação do FGF a regiões específicas nos receptores de FGFR promovendo assim, um aumento das respostas à angiogênese. Dessa forma é sugerido que carboidratos sulfatados, com estrutura análoga ao sulfato de heparana ou heparina, a exemplo os sulfatos de condroitina e glucosamina, possam ligar fatores de crescimento à regiões específicas de seus receptores, formando complexos de alta afinidade e consequentemente, modulando de forma positiva a angiogênese.

1.4 Algumas características químicas e funcionais dos sulfatos de condroitina e glucosamina

Os resultados de estudos prévios reportados na literatura têm mostrado a importância dos efeitos terapêuticos alcançados com o uso dos sulfatos de

condroitina (SC) e de glucosamina (SG). Tais efeitos foram demonstrados em tratamentos com pacientes portadores de osteoartrite, tendo sido constatados a remissão das dores, o restabelecimento dos movimentos articulares e a estabilização da deterioração ou mesmo a possível regeneração da cartilagem que protege as extremidades dos ossos (TYMOTHY *et al.*, 2000; PAVELKÁ *et al.*, 2002; ANDERSON; NICOLOSI; BORZELLECA, 2005; VANGSNESS; SPIKER, 2009).

O SC e o SG são componentes importantes da maioria dos tecidos dos vertebrados. O SG é derivado da glucosamina, um aminoaçúcar de ocorrência natural, produzido pelo organismo humano dentro de células denominadas condrócitos a partir de moléculas de glicose, na presença de glutamina (um aminoácido essencial) (HÄUSELMANN, 2001). Este carboidrato encontrado naturalmente no tecido conjuntivo e na cartilagem contribui para a manutenção da contração, flexibilidade e elasticidade destes tecidos (ANDERSON; NICOLOSI; BORZELLECA, 2005). Comercialmente, a glucosamina pode ser encontrada em duas formas: glucosamina-cloridrato e SC (glucosamina-6-sulfato, Figura 3). Esta última tem apresentado maior eficácia biológica, devido a presença do grupamento sulfato, o qual é importante para a síntese das GAG e muito utilizada no tratamento da osteoartrite em modelos humanos e animais (BORN *et al.*, 1995; BARNHILL *et al.*, 2006; BRUYERE; REGINSTER, 2007).

Estudos sugerem que o rápido efeito sobre os sintomas da osteoartrite é explicado pelos efeitos anti-inflamatórios moderados exercidos através da supressão da formação de radicais superóxido ou da inibição da síntese induzida de óxido nítrico e, seletivamente, da via da ciclooxygenase-2 (PAVELKA, 2002; ANDERSON; NICOLOSI; BORZELLECA, 2005). Embora haja evidências em favor dos efeitos benéficos da glucosamina, os mecanismos biológicos permanecem em grande parte desconhecidos.

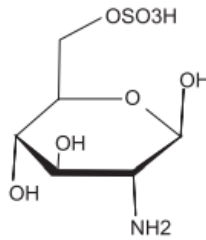


Figura 3. Estrutura química do sulfato de glucosamina (glucosamina-6-sulfato) (Adaptado de ROSSIGNOLI; PONTAROLO; CORRER, 2008).

A glucosamina está envolvida como constituinte na formação das GAG, atuando como precursor de unidades de dissacarídeos (ANDERSON; NICOLSI; BORZELLECA, 2005; LOZADA, 2007). GAG são polissacarídeos lineares compostos por unidades dissacarídicas que se repetem, onde uma das unidades é um ácido urônico e a outra um aminoaçúcar (glucosamina), podendo apresentar substituições de grupamento sulfato ao longo da cadeia. Existem diversos tipos de GAG, como o ácido hialurônico ou hialurona, heparina, sulfato de heparana, sulfatos de condroitina, dermatana e queratana. Estes componentes são sulfatados na maioria das GAG, aumentando seu caráter aniônico o que contribui para a efetividade em respostas biológicas. A hialurana é a única entre as GAG que não contém qualquer sulfato e não está ligada covalentemente à proteína (VARKI *et al*, 1999; YIP; SMOLLICH; GÖTTE, 2006; YUNG; CHAN, 2007).

As GAG carregadas negativamente geram uma grande pressão osmótica e sua conformação molecular produz uma matriz resistente à compressão que permite a difusão de solutos através de um meio líquido (YIP; SMOLLICH; GÖTTE, 2006). Os GAG possuem importante papel na ativação, proliferação, migração e diferenciação das células por serem capazes de sequestrar proteínas (fatores de crescimento, por exemplo) e levá-las aos sítios apropriados para ativação nas células (CHEN *et al.*, 2006; YUNG; CHAN, 2007).

O SC é um tipo de GAG, presente predominantemente nas matrizes extracelulares das células, sendo mais abundantes nos tecidos conjuntivos, na cartilagem, na pele, nos vasos sanguíneos, como também nos osso, ligamentos e tendões. Este polissacarídeo é sintetizado pelas células ligado covalentemente a proteínas, sendo secretados para a matriz na forma de proteoglicanos (PG) (HARDINGHAM, 1998). O SC originado da cartilagem de mamíferos e

principalmente do corpo humano são encontradas em duas formas, mostradas na Figura 4, que variam quanto a posição do grupamento sulfato: sulfato de condroitina 4 (posição CS4) e sulfato de condroitina 6 (posição CS6) (SENO *et al.*, 1975; BAYLISS *et al.*, 1999). A concentração exata desses polímeros na matriz extracelular do tecido cartilaginoso pode variar de acordo com a idade e com o estado de desenvolvimento do indivíduo (BAYLISS *et al.*, 1999).

O SC, como mencionado anteriormente tem sido bastante utilizado como tratamento para a osteoartrite. Estudos mostram que este polissacarídeo apresenta propriedades anti-inflamatórias, estimula a síntese de proteoglicanos e colágeno, pode restabelecer os condrócitos na cartilagem e inibe enzimas da degradação da matriz (proteases) (BODE *et al.*, 1999; PENICHE *et al.*, 2007; MONFORT *et al.*, 2008).

Outro importante papel que o SC apresenta está relacionado a cicatrização de feridas. Estudos mostraram que este polímero promove a proliferação de fibroblastos, e ainda, dependendo da posição do grupamento sulfato na molécula, ele pode estimular ou inibir a adesão dessas células (ZOU *et al.*, 2009).

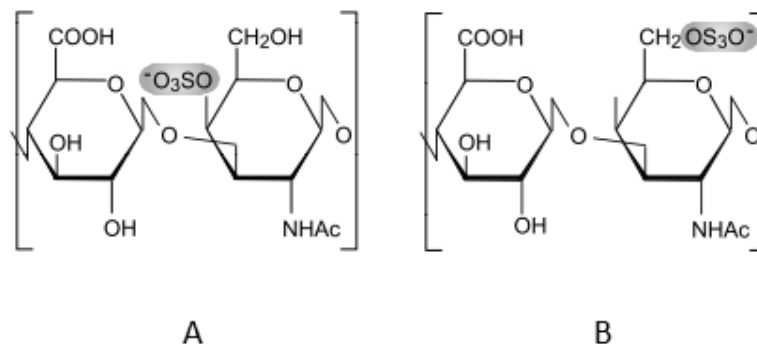


Figura 4. Unidades de dissacarídeo do sulfato de condroitina 4 – A e sulfato de condroitina 6 – B (Adaptado de SUGAHARA *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, a heparina (GAG) e o HSPG (proteoglicana) possuem importante papel na angiogênese por interagir com o FGF2, modulando os mecanismos de proliferação, migração, diferenciação e de sobrevivência de células endoteliais, envolvidos na formação inicial de vasos

sanguíneos durante a embriogênese (vasculogênese) e angiogênese (NUGENT; IOZZO, 2000). A literatura tem mostrado que a proteoglicana de sulfato de condroitina (CSPG) participa ativamente na sinalização do FGF2 (BAO *et al.*, 2004; MOLTENI, *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2007). A CSPG modula positivamente a ligação de FGF2 no respectivo receptor (FGFR) na superfície celular, tanto de forma individual, em sítios de ligação de baixa afinidade (SMITH *et al.*, 2007) quanto em cooperação com o sulfato de heparana (DEEPA *et al.*, 2004).

Visto que relativamente poucos estudos abordam o envolvimento do SC e SG no processo angiogênico, sendo inclusive focados mais na eficiência do uso dessas substâncias em doenças inflamatórias nas articulações, é importante investigar a atividade dos referidos carboidratos sulfatados na formação de vasos sanguíneos em diferentes contextos fisiológicos, por meio de modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.5 Geometria fractal aplicada na rede vascular

O termo fractal foi criado por Benoit Mandelbrot na década de 70, cuja acepção etimológica procede do radical *fractus* proveniente do verbo *frangere*, que significa “produzir pedaços irregulares”, “quebrar”. Ele introduziu esta palavra para designar estruturas que são caracterizadas pela forma extremamente irregular ou fragmentada e que repete estaticamente a mesma estrutura em diferentes escalas (SILVA; MEDONÇA; REIS, 2003; CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Esses objetos são caracterizados por algumas propriedades: 1) auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo são semelhantes ao objeto ou processo todo; 2) dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; (3) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da auto-similaridade e dependência de escala e 4) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais, que se caracterizam pela inexistência de medidas de centralidade e dispersão dos objetos e processos fractais (BASSINGTHWAIGHTE; LIEBOVITCH; WEST, 1994).

É importante observar que a dimensão fractal pode apresentar, ao contrário da dimensão euclidiana, valores fracionários variando entre: a dimensão do ponto e da reta $0 < D < 1$; entre dimensão da reta e do plano $1 < D < 2$ e entre a dimensão do

plano e do espaço $2 < D < 3$. Este valor é uma medida proporcional do espaço realmente ocupado por um sistema desordenado ou estrutura irregular (SILVA *et al.*, 2003).

A geometria fractal tem se mostrado uma técnica objetiva para detectar modificações em diversos sistemas biológicos (SCHULZE *et al.*, 2008). Tendo em vista que o sistema vascular sanguíneo é uma rede complexa de estruturas tubulares ramificadas que estão irregularmente distribuídas nos diversos tecidos, podendo ser considerado um objeto fractal devido a sua auto-similaridade, irregularidade, dimensão fracionária e dependência de uma escala de observação (GRIZZI *et al.*, 2005). Diversos estudos têm utilizado a geometria fractal como uma ferramenta apropriada, capaz de descrever a formação de vasos sanguíneos em vários modelos animais, tais como os estudos no desenvolvimento da rede vascular na membrana corioalantoide (CAM) do embrião de galinha (KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER; 1996; ARLT; SCHMID-SCHÖNBEIN; BAUMANN, 2003), na CAM do embrião de codorna (PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998), no embrião de *zebrafish* (CHAN; CHENG, 2003), no córtex cerebral humano (CASSOT *et al.*, 2006) e na retina humana (KUNICK *et al.*, 2009).

Sendo assim, a dimensão fractal pode representar um parâmetro rápido e confiável para avaliação da angiogênese, servindo assim no diagnóstico vascular e permitindo o monitoramento da eficácia no tratamento angiogênico e anti-angiogênico doenças (MANCARDI *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação do sulfato de condroitina (SC) e do sulfato de glucosamina (SG) em processos de formação de vasos sanguíneos por meio de modelos (1) *in vitro* frente a células da linhagem endotelial de veia umbilical humana (HUVEC) e (2) *in vivo* em membranas anexas de embriões de *Gallus domesticus*, bem como na angiogênese avançada em camundongos (*Mus musculus*) adultos.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar *in vitro* a atividade de concentrações crescentes de SC e SG sobre a viabilidade de culturas de HUVEC, com base no ensaio de citotoxicidade do MTT;
- Avaliar *in vitro* os efeitos da administração de e SC e SG no processo de proliferação celular, por meio da técnica de imuno-histoquímica e auxílio do biomarcador para DNA – BrdU;
- Avaliar *in vitro* a ação de SC e SG na diferenciação celular, com ênfase no processo de tubulogênese vascular, utilizando suportes de Matrigel;
- Analisar os efeitos de diferentes concentrações de SC e SG nos processos de angiogênese e/ou vasculogênese, nas membranas extraembrionárias corioalantóica (*ensaio da CAM*) e vitelínica (*ensaio da YSM*) de embriões de *G. domesticus* de 8 e 4 dias de incubação, respectivamente;
- Quantificar, a partir dos resultados dos dois ensaios acima (*CAM* e *YSM*), os efeitos da administração de SC e SG na vascularização das membranas extraembrionárias por meio da utilização de dois tipos de metodologia para o cálculo da dimensão fractal (*informação* – D_{INF} e *box-counting* - D_{BC});

- Investigar, com base na quantificação da hemoglobina (Espectroscopia), os efeitos da administração de SC e SG no processo de angiogênese avançada de camundongos adultos, a partir da vascularização induzida em implantes subcutâneos de Gelfoam.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-AUDA, W.; BENZA, R.L. Therapeutic angiogenesis: review of current concepts and future directions. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 22, p. 370-82, 2003.

ARLT, C.; SCHMID-SCHÖNBEIN, H.; BAUMANN, M. Measuring The Fractal Dimension Of The Microvascular Network Of The Chorioallantoic Membrane. **Fractals**, v.11, n. 2, p. 205-212, 2003.

ANDERSON, J.M.; NICOLOSI, R.J.; BORZELLECA, J.F. Glucosamine effects in human: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 187-201, 2005.

AUERBACH, R.; AUERBACH, W. Vasculogenesis and angiogenesis, 2002. In: FAN T. P. D; KOHN, E. C. **The New Angiotherapy**. Humana Press, Totowa NJ. p 1-6.

BAO, X. *et al.* Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of I-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9765–9776, 2004.

BARNHILL, J *et al.* Chondroitin product selection for the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 14-24, 2006.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, B.J. **Fractal physiology**. New York: Oxford University Press, 1994. 364p.

BAYLISS, M.T. *et al.* Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 28, n. 274, p. 15892-15900, 1999.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 401-410, 2003.

BHADADA, S. V.; GOYAL, B. R.; PATEL, M. M. Angiogenic targets for potential disorders. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 29–47, 2011.

BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 69-74, 1995.

BLASCHUK, O.W.; ROWLANDS, T.M. Cadherins as Modulators of Angiogenesis and the Structural Integrity of Blood Vessels. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 19, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

BODE, W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 639–52, 1999.

BORN, J. V. D. *et al.* Presence of N-Unsubstituted Glucosamine Units in Native Heparan Sulfate Revealed by a Monoclonal Antibody. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 52, p. 31303–31309, 1995.

BRADE, T.; MANNER, J.; KUHL, M. The role of signaling in cardiac development and tissue remodeling in the mature heart. **Cardiovascular Resource**. v. 72, p. 198-209, 2006.

BRINDLE, N.P.; MCCARTHY, M.J.; BELL, P.R. Angiogenic revascularization in ischaemic disease. Molecular techniques hold promise, though they are still some way off. **BMJ**, v. 318, p. 1500-1, 1999.

BRUYERE, O.; REGINSTER, J.Y. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. **Drugs & Aging**, v. 24, p. 573-80, 2007.

CABALLERO, S. *et al.* Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. **Diabetes**, v. 56, p. 960-967, 2007.

CAO, Y. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 1304-1308, 2010.

CARMELIET P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, p. 435–439, 1996.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653-660, 2003.

CASSOT, F. *et al.* A novel three-dimensional computer-assisted method for a quantitative study of microvascular networks of the human cerebral cortex. **Microcirculation**, v. 13, p. 1–18, 2006.

CHAN, P. K, CHENG, S.H. Fractal analysis of vascular complexity in cadmium-treated zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 83-87, 2003.

CHIPPERFIELD, H. *et al.* Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 46, p. 661-670, 2002.

CHRISTIE, J *et al.* Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 604-617, 2008.

CLOVER, A. J. P.; MCCARTHY, M. J. Developing strategies for therapeutic angiogenesis: vascular endothelial growth factor alone may not be the answer. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 56, p. 31-4, 2003.

CUNHA JR, H *et al.* Caos e fractal: uma introdução pedagógica pela cultura para os cursos de engenharia elétrica. In: WCETE – World Congresso on Engineering and Technology Education, 2004, Santos. **WCETE**. São Paulo. 2004, p. 1549-1552.

DAVIS, S. *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell**, v. 87, p. 1161-9, 1996.

DEEPA, S. S. *et al.* Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 37368–37376, 2004.

DIAS, P. F. *et al.* Na formação de vasos sanguíneos, fronteiras entre saúde e doença. **Ciência Hoje**, v. 32, p. 22 – 27, 2003.

DIAS, P. F. **Modulação da vasculogênese, angiogênese e de desenvolvimento tumoral por derivados de Sargassum stenophyllum (phaeophyceae)**. Florianópolis, 2005. 181p. Tese (Doutorado em Farmacologia).

DUAN, L. J.; NAGY, A.; FONG, G.H. Gastrulation and angiogenesis, not endothelial specification, is sensitive to partial deficiency in vascular endothelial growth factor- α in mice. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 1852–1858, 2003.

DVORAK, H. F. Discovery of vascular permeability factor (VPF). **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 522–526, 2006.

EMANUELI, C.; MADEDDU, P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. **British Journal Pharmacology**, v. 133, p. 951-8, 2001.

FACHINGER, G.; DEUTSCH, U.; RISAU, W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. **Oncogene**, v. 18(43), p. 5948-5953, 1999.

FERRARA, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v. 380, p. 439–442, 1996.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, p. 851-858, 1989.

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967–974, 2005.

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

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p.1-18. 2006.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. *et al.* Heparin-binding angiogenic protein-basic Fibroblast Growth Factor is stored within basement membrane. **American Journal of Pathology**, v. 130, p. 393-400, 1988.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Advances in Experimental Medicine in Biology**, v. 313, p. 355-364, 1992.

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

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 643–651, 2003.

FUSTER, M. M.; WANG, L. Endothelial heparan sulfate in angiogenesis. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 93, p. 179-212, 2010.

GOOD, D. J. *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **PNAS**, v. 87, p. 6624-8, 1990.

GRIZZI, F. *et al.* Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**, v. 5, n. 14, p. 1-9, 2005.

HARDINGHAM, T. E. *et al.* Cartilage proteoglycans: assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. **Biochemical Journal**, v. 253, p. 175-185, 1988.

HARDINGHAM, T. Chondroitin sulfate and joint disease. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 6, p. 3-5, 1998.

HÄUSELMANN, H. J. Nutripharmaceuticals for osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 595-607, 2001.

ISNER J. M.; ASAHARA, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. **JCI**, v. 103, n. 9, p. 1231-6, 1999.

ITOH, N.; ORNITZ, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genetics**, v. 20, p. 563–9, 2004.

JONES, N. *et al.* Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 257-267, 2001.

KAMPHAUS, G. D. *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1209-15, 2000.

KIRCHNER, L. M.; SCHMIDT, S. P.; GRUBER, B. S. Quantitation of Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane Model Using Fractal Analysis. **Microvascular Research**, v. 51, p. 2–14, 1996.

KLAGSBRUN, M.; MOSES, M. A. Molecular angiogenesis. **Chemistry & Biology**, v. 6, p. 217–224, 1999.

KLICHE, S.; WALTENBERGER, J. VEGF receptor signaling and endothelial function. **IUBMB Life**, v. 52, p. 61–6, 2001.

KOMORI, M. *et al.* A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber. **Anesthesia & Analgesia**, v. 100, p. 830–4, 2005.

KUNICKI, A.C.B *et al.* Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 930-934, 2009.

LIU, X.C. *et al.* Heparin- and Basic Fibroblast Growth Factor-incorporated Stent: A New Promising Method for Myocardial Revascularization. **Journal of Surgical Research**, v. 164, n. 2, p. 204-213, 2010.

LOZADA, C. J. Glucosamine in osteoarthritis: questions remain. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 74, p. 65-71, 2007.

MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; KALLURI, R. Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23745-50, 2000.

MAIONE, T. E. *et al.* Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. **Science**, v. 247, p. 77-9, 1990.

MAISONPIERRE, P. C. *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**, v. 277, p. 55-60, 1997.

MANOLOPOULUS, V. G. *et al.* Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. **General Pharmacology**, v. 34, p. 107–116, 2000.

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 23-24, 2001.

MELO-REIS, P. R. *et al.* Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MIQUEROL, L.; LANGILLE, B. L.; NAGY, A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. **Development**, v. 127, p. 3941–3946, 2000.

MOLTENI, M. *et al.* Alterations of matrix- and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. **Cell Tissue Research**, v. 295, p. 523–536, 1999.

MONFORT, J. *et al.* Biochemical basis of the effect of chondroitin sulphate on osteoarthritis articular tissues. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 735-40, 2008.

MOSER, T. L. *et al.* Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. **PNAS**, v. 96, p. 2811-16, 1999.

MUKHOPADHYAY, D.; ZENG, H.; BHATTACHARYA, R. Complexity in the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptors signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 264, p. 51–61, 2004.

MUNDEL, T.; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. **Microvascular Resource**, v. 74, p. 85–89, 2007.

MUROHARA, T. Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization. **Nagoya Journal of Medical Science**, v. 66, p. 1-7, 2003.

NASTRI, C. O. *et al.* Câncer de mama e disfunção endotelial. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 5, 2008.

NESSA, A. *et al.* Angiogenesis-a novel therapeutic approach for ischemic heart disease. **Mymensingh Medical Journal**, v. 18, n. 2, p. 264-72, 2009.

NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. **Cancer Research**, v. 65, p. 3967-79, 2005.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 115–120, 2000.

OH, H. *et al.* Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15732-9, 1999.

OH, I. *et al.* Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3891-9, 2007.

OLSSON A. K. *et al.* VEGF receptor signaling in control of vascular function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 359–371, 2006.

O'REILLY, M. S. *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 79, p. 315-28, 1994.

O'REILLY, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277- 85, 1997.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biology**, v. 2, p. 1-12, 2001.

PARSONS-WINGERTER, P. *et al.* A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bfgf and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. **Microvascular Research**, v. 55, p. 201–214, 1998.

PATENAUDE, A.; PARKER, J.; KARSAN, A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. **Microvascular Research**. v. 79, n. 3, p. 217-23, 2010.

PAVELKA, K. *et al.* Glucosamine sulphate use and delay of progression of knee osteoarthritis. **Archives of Internal Medicine**, v. 14, n.162, p. 2123-2123, 2002.

PÉAULT, B. Hemangioblasts: back to the future? **Blood**, v. 116, p. 2864–2865, 2010.

PENICHE, C. *et al.* Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1719-1726, 2007.

PERSSON, A. B.; BUSCHMANN, I. R. Vascular growth in health and disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 14, 2011.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 6, p. 230–247, 1995.

PRESTA, M. *et al.* Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 159–78, 2005.

RAFII, S.; LYDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 702–712, 2003.

RIBATTI, D. *et al.* Human recombinant interferon alpha-2a inhibits angiogenesis of chick area vasculosa in shell-less culture. **International Journal of Microcirculation**, v 16, p.165-9, 1996.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. The Discovery of angiogenic factors: A historical review. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 35, p. 227-231, 2000.

RIBATTI, D. *et al.* Postnatal vasculogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 100, p. 157-163, 2001.

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

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

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

ROSENGART, T. K. *et al.* Therapeutic angiogenesis: A comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. **Journal of Vascular Surgery**, v. 26, n. 2, p. 302-312, 1997.

ROSSIGNOLI, P.; PONTAROLO, R.; CORRER, C. J. Determinação espectroscópica multivariada de glucosamina e condroitina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, vol. 31, n. 6, p. 1285-1289, 2008.

RÜGER, B. *et al.* Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 7, p. 2157-66, 2004.

RUITER, M.C. *et al.* The early formation of the Vascular System in Quail Embryos. Development of the Vascular System in the Embryo. RUITER, M.C. A concept of the

origin of systemic-pulmonary collateral arteries. Cap. 5; Koninklijk. e Leiden, p. 99–186, 1992.

RUSNATI, M.; PRESTA, M. Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycan. Biological implications in neovascularization. **International journal of clinical & laboratory research**, v. 26, p.15–23, 1996.

SABTI, H. A. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 2, p. 1-7, 2007.

SAHNI, A. *et al.* FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. **Blood Journal**, v. 107, p. 126-131, 2006.

SAITO, A.; MUNAKATA, H. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2452–2460, 2004.

SCHWARTZ, S. *et al.* Drug modification of angiogenesis in a rat cornea model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, p. 250-254, 2008.

SENO, N. *et al.* Microheterogeneity of Chondroitin Sulfates from Various Cartilages. **Connective Tissue Research**, v. 3, n. 1, p. 87-96, 1975.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 549–560, 2006.

SHING, Y. *et al.* Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. **Science**, v. 223, p. 1296-1299, 1984.

SHRADDHA, V. B.; BHOOMIKA, R. G.; MAYUR, M. P. Angiogenic targets for potential disorders. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 29–47, 2011.

SHULZE, M. M. HUTCHINGS, N.; SIMPSON, T. L. The use of fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 49, n.4, p.1398-1406, 2008

SILVA, A.C; MEDONÇA, E.S.; REIS, C. Dimensão fractal de ácidos húmicos em diferentes condições experimentais. **Química Nova**. V. 26, n.3, p. 344-346, 2003.

SILVA, R. *et al.* Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 10, p. 1703-13, 2008.

SMITH, S.M.L. *et al.* Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF-2 to FGF receptors. **Matrix Biology**, v. 3, p. 175–184, 2007.

STANDKER, L. *et al.* Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. **FEBS Letters**, v. 420, p. 129-33, 1997.

STRINGER, S.E. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. **Cytokine Proteoglycan Interactions**, v. 34, p. 451-453, 2006.

SUGAHARA, K. *et al.* Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, p. 612–620, 2003.

SZEKANECZ, Z. *et al.* Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 3, p. 299-306, 2010.

TAKESHITA, S. *et al.* Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 662–670, 1994.

THURSTON, G. *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, p. 460-3, 2000.

TIMOTHY, E. *et al.* Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis A Systematic Quality Assessment and Meta-analysis. **JAMA**, v. 283, p. 1469-1475, 2000.

TOBELEM, G. Endothelial cell growth: Biology and Pharmacology in relation to angiogenesis. **Blood Coagulation and Fibrinology**, v. 1, p. 703-705, 1990.

TUETTENBERG, J.; FRIEDEL, C.; VAJKOCZY, P. Angiogenesis in malignant glioma – A target for antitumor therapy? **Critical Review in Oncology/Hematology**, v. 59, p. 181-193, 2006.

VANGSNESS, C. T. J.; SPIKER, W. E. A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis. **Journal of Arthroscopy**, v. 25, n. 1, p. 86-94, 2009.

VARKI, A. *et al.* Proteoglycans and glycosaminoglycans. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; p. 145–60, 1999.

YANAGISAWA-MIWA, A. *et al.* Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. **Science**, v. 257, p. 1401–1403, 1992.

YANCOPOULUS, G.D. *et al.* Vascular - specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, p. 242–247, 2000.

YIP, G.W.; SMOLLICH, M.; GÖTTE, M. Therapeutic value of glycosaminoglycans in câncer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 2139-2148, 2006.

YAYON, A. *et al.* Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**, v. 22, n. 64(4), p. 841–848, 1991.

YUNG, S.; CHAN, T. M. Glycosaminoglycans And Proteoglycans: Overlooked Entities? **Peritoneal Dialysis Internacional**, v. 27, n. 2, p. 104-10, 2007.

WAGENER, C.; ERGÜN, S. Angiogenic Properties of the Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule. **Experimental Cell Research**, v. 261, p. 19–24, 2000.

WILLIAMS, T.A. *et al.* Protective effect of spironolactone on endothelial cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2496-505, 2006.

WILTING, J.; EICHMANN, A.; CHRIST, B. Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. **Cell Tissue Research**, v. 288, n. 2, p. 207-23, 1997.

ZAMMARETTIA, P.; ZISCHA, A. H. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

ZOU, X. H. *et al.* Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing. **Acta Biomatereritalia**, v. 5, n. 5, p. 1588-95, 2008.

4. CAPÍTULO I

Artigo submetido a revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*

Propriedades angiogênicas dos sulfatos de glucosamina e condroitina: um estudo *in vivo* por meio da análise fractal

Fernanda Katharine de Souza Lins Borba^{1,2}, Giovanni Loos Queiroz Felix², Lisiê Silva², Paulo Fernando Dias², Romildo Albuquerque Nogueira¹

¹Laboratório de Biofísica Teórico, Experimental e Computacional, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Brasil.

²Laboratório de Estudos em Embrioatividade e Morfogênese Animal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, Florianópolis, Brasil

Autor para correspondência: R. A. Nogueira: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, Email: ran.pe@terra.com

Resumo

A membrana corioalantóide (CAM) do embrião de galinha é frequentemente usada como um modelo *in vivo* para investigar a angiogênese. Com base na CAM, utilizou-se o modelo da membrana do saco vitelínico (YSM), que se apresenta como um método *in vivo* simples e de fácil estudo na identificação de substâncias que interferem na vasculo-angiogênese. Um modelo de processamento de imagem foi desenvolvido para analisar os vasos e especialmente os capilares do YSM após a exposição ao sulfato de glucosamina (SG; 0,001-0,1 mg/implante) e sulfato de condroitina (SC; 0,001-0,1 mg/implante). O resultado foi uma imagem binária de redes microvasculares. As dimensões fractais de *box-counting* (D_{BC}) e informação (D_{INF}) foram utilizadas para quantificar a atividade vasculo-angiogênica do SG e SC. O SG (0,001-0,1mg) implantado no 2º dia na YSM proporcionou um aumento das dimensões fractais, expresso num maior número de vasos vitelínicos em relação ao grupo controle. No entanto, o SC somente nas concentrações de 0,03-0,1 mg/implante foram eficazes. Além disso, apenas na maior concentração testada do SC e do SG (0,1 mg/implante), os valores de D_{BC} e D_{INF} foram semelhantes aos do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2). Dessa forma, sugerimos que o SC e o SG atuem como moduladores, estimulando os processos de vasculogênese e angiogênese na YSM do embrião de galinha. Além disso, ambos os métodos, D_{BC} e D_{INF} , foram sensíveis na detecção de alterações nos padrões vasculo-angiogênicos, demonstrando ser uma metodologia eficaz em estudos voltados a caracterização de novas substâncias por permitir uma quantificação precisa da formação de vasos sanguíneos.

Palavras-chave: sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina, angiogênese, vasculogênese, dimensão fractal, membrana do saco vitelínico de galinha.

1. Introdução

Durante a embriogênese, a formação dos primeiros vasos sanguíneos ocorre por vasculogênese, a qual é um processo definido como a formação de vasos sanguíneos primordiais a partir da diferenciação *in situ* de células endoteliais progenitoras (angioblastos) mesodérmicas, em células endoteliais (Hanahan e Folkman, 1996; Cameliét, 2003; Pandya *et al.*, 2006). Posteriormente, estes grupos de células estabelecem um plexo vascular primordial (Ruiter *et al.*, 1992; Asahara e Isner, 2002). A formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros preexistentes é denominada angiogênese, e está relacionada a uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (Folkman, 1995; Pandya *et al.*, 2006; Poveshchenko e Konenkov, 2010). No entanto, estudos mostram que progenitores de células do endotélio vascular também são encontrados em adultos, e estas podem em determinadas situações estimular ou inibir a formação de vasos (vasculogênese adulta) estando associadas a algumas patologias, tais como o câncer e isquemia (Zammaretti e Zisch, 2005; Young *et al.*, 2007; Tongers *et al.*, 2010).

A vasculogênese e a angiogênese são estimuladas por um grande número de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Cameliét, 2003; Pandya *et al.*, 2006). O FGF2 é liberado principalmente por células lesadas nas feridas (Arciniegas *et al.*, 2003). A produção de VEGF é regulada positivamente em condições de hipóxia, tais como as encontrados em tecidos isquêmicos (Liu *et al.*, 2011). O FGF2 bem como o VEGF-A são membros de uma grande família de proteínas que se ligam aos seus respectivos receptores de tirosina-quinase na superfície celular. De fato, o FGF2 extracelular se liga à proteoglicanas de sulfato de heparana (HSPG) e a

heparina da matriz extracelular (MEC) modulando a função de vários de tipos de células (Guimond *et al.*, 1993; Nugent e Iozzo, 2000; Qiao *et al.*, 2003).

Assim como algumas substâncias encontradas na matriz extracelular, as proteoglicanas são também moléculas importantes envolvidas no estímulo da angiogênese, atribuída principalmente a presença de moléculas de heparana, altamente sulfatadas, que formam complexos de alta afinidade com o FGF2 e seus receptores (FGFR), promovendo, assim, um aumento de respostas biológicas à angiogênese. Além da heparina e do sulfato de heparana, altamente sulfatados, alguns outros polissacarídeos sulfatados também podem interferir no crescimento celular do endotélio vascular (Stringer, 2006; Iozzo e Sanderson, 2011). A nossa hipótese é que o sulfato de condroitina (SC) e o sulfato de glucosamina (SG) como são compostos com composição semelhante ao sulfato de heparana (Yip *et al.*, 2006), poderiam ser moduladores eficazes da angiogênese. O SC e o SG são encontrados na cartilagem de mamífero e têm sido amplamente aplicados no tratamento de doenças cardiovasculares e osteoartrite (Ma *et al.*, 2002; Saito e Munakata, 2004). A determinação da eficácia de substâncias que regulam a angiogênese requer a utilização de ensaios angiogênicos. Em estudos *in vivo* quantitativos e qualitativos da angiogênese, muitos modelos biológicos são utilizados (Gimbrone, 1974; Gabison *et al.*, 2004; Tufan e Satiroglu-Tufan, 2005), dentre estes se destaca o modelo da membrana corioalantóide (CAM) do embrião de galinha (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Vu *et al.*, 1985; Peek *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1994) que é talvez o modelo *in vivo* mais utilizado para o estudo do desenvolvimento dos vasos (Ribatti *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010). Com base no ensaio da CAM, foi utilizado o modelo da membrana do saco vitelínico (YSM) do embrião de galinha, para testar a eficiência do SC e SG na modulação da vasculo-angiogênese.

Este método inclui algumas vantagens em relação ao ensaio CAM, por exemplo, a imaturidade do sistema nervoso do embrião, a menor duração do tempo de incubação e a possibilidade de avaliar o início da formação dos vasos sanguíneos - vasculogênese (Chapman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2008a, 2008b). No entanto, quantificar o surgimento ou inibição de vasos sanguíneos neste ensaio tem sido difícil e muitas vezes são feitos usando métodos de avaliação subjetivos, gerando dificuldades na comparação dos resultados (Sologub *et al.*, 1992; Hisa *et al.*, 1998; Tamilarasan *et al.*, 2006). Dessa forma, a análise dos dados obtidos nos ensaios na CAM, bem como na YSM e em outros ensaios angiogênicos necessita de estatística e medidas precisas na avaliação dos resultados. Tendo em vista que a rede vascular bem estabelecida pode ser considerada um objeto fractal, devido as suas propriedades de auto similaridade, irregularidade da dimensão fracionária e dependência na escala das dimensões dos vasos sanguíneos, estamos propondo o uso da geometria fractal para fornecer uma medida objetiva da atividade vasculo-angiogênica do SG e SC na rede microvascular na YSM de embriões de galinha.

2. Materiais e Métodos

2.1 *Materiais*

O SC e SG utilizado nestes experimentos foram gentilmente cedidos pela empresa Phytomare® (Governador Celso Ramos, SC, Brasil) com pureza superior a 90%.

2.2 *Animais*

Os ovos de galinha fertilizados (linhagem Ross, n = 6), livres de patógenos, foram fornecidos por uma empresa avícola (Tyson S.A., SC, Brasil).

Todos os estudos em animais foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no número de protocolo PP00586/2011/CEUA/UFSC, aprovado pelo Comitê de ética para uso de animais (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil).

2.3 Ensaio na YSM do embrião de galinha

A habilidade do SC e SG em estimular a vasculogênese e a angiogênese foi determinada pelo ensaio da YSM, de acordo com o método descrito por Dias *et al.* (2008). Ovos de galinha fertilizados foram fornecidos por um incubatório comercial local (descrito anteriormente) e incubados a 37,5 °C com 70% de umidade relativa. Após 48 hs, os ovos foram removidos da incubadora, e uma janela (10 mm de diâmetro) foi aberta na casca do ovo, numa posição adjacente ao embrião. O tratamento *in ovo* foi realizado através da implantação de suportes em forma de disco de metilcelulose (volume de 7,5 µL, diâmetro de 3 mm; um disco por embrião) adsorvidos com SC, SG e FGF2 (controle positivo) na YSM no 2º dia de desenvolvimento, numa região próxima ao embrião, onde as ilhotas sanguíneas presentes estabelecerão uma rede capilar primordial, como evidência da vasculo-angiogênese. Após estas manipulações, as janelas foram fechadas com fita isolante preta e os ovos foram devolvidos à incubadora até o 4º dia (96 h, ou estágio embrionário E4). As concentrações de SC e SG administrada às membranas vasculares por meio do disco de metilcelulose variaram de 0,001 a 0,1 mg/disco. Os discos contendo o FGF2 (50 ng/disco) e os discos de metilcelulose (água ultrafiltrada como solvente; pH 7,2) foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Para cada ovo, as imagens foram capturadas com uma câmera Motic 1000 de 1.3 MP acoplada a um microscópio estereoscópico (20x). Os vasos

da região em torno do limite do disco de metilcelulose foram quantificados através do cálculo da dimensão fractal.

2.4 Segmentação das imagens

As imagens digitais foram processadas para calcular a dimensão fractal da rede vascular do YSM como a seguir. Primeiro, as imagens foram segmentadas manualmente usando o Microsoft® Paint visando separar os vasos sanguíneos do restante das imagens. Cada vaso foi traçado por uma linha com espessura de um pixel, após este procedimento as imagens foram binarizadas (fundo em preto e os vasos em branco), usando o mesmo programa. Por fim, o software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System foi utilizado para calcular as dimensões fractais dos vasos sanguíneos.

2.5 Análise fractal

Os métodos utilizados para calcular a dimensão fractal foram a Dimensão de *Box-Counting* (D_{BC}) e Dimensão de Informação (D_{INF}). Os cálculos do D_{BC} e da D_{INF} foram realizados pelo Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System. Na D_{BC} o objeto fractal em estudo é coberto com $N(r)$ caixas de tamanhos diferentes em escala decrescente e é contado o número de caixas que contém ao menos um ponto (pixel) da estrutura analisada. Após esse procedimento, traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função dos lados das caixas r (KUNICKI et al., 2009). A inclinação desse gráfico é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente através da seguinte expressão:

$$D_{BC} = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \varepsilon) - \log N(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log(r)} \right]$$

O D_{INF} é um método capaz de caracterizar uma estrutura fractal que não é homogênea em sua invariância de escala. O objeto também é coberto por caixas, mas leva em conta a probabilidade relativa de ocupação das caixas elementares utilizadas para cobrir o objeto fractal. Em outras palavras, o tamanho dependerá da frequência em que cada caixa é visitada. Este método pode ser definido pela seguinte expressão:

$$D_{INF} = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{(S(r + \varepsilon) - S(r))}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right]$$

Onde, $S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$ é denominado entropia de Kolmogorov. N é o número de caixas, $m_i = M_i/M$, sendo M_i o número de pontos na i -ésima caixa e M é o número total de pontos do objeto fractal (KUNICKI et al., 2009).

2.6 Análise de dados e estatística

Os dados estão representados como média \pm S.E.M. obtido a partir de pelo menos dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e posteriormente foi realizado o teste “*post hoc*” de Tukey. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram menores que 0,05.

3. Resultados

Neste estudo, o ensaio da YSM foi utilizado para determinar se o SG e SC promovem vasculo- e angiogênese, como eventos primordiais da vascularização. Este processo foi avaliado em torno do disco de metilcelulose na YSM do embrião de galinha (implantado após 2 dias da incubação preliminar: E2).

A Figura 1 mostra as imagens da rede vascular eskeletonizadas do ensaio da YSM, para os grupos tratados com SC e/ou FGF2 e o grupo controle, e a Figura 2 mostra as dimensões fractais de D_{BC} e D_{INF} destes grupos.

Pela inspeção visual das imagens eskeletonizadas (Figura 1), verifica-se um aumento no número de vasos sanguíneos apenas na maior concentração do SC testada (0.1 mg/mL) e no grupo tratado com FGF2 quando comparado ao controle. A dimensão fractal confirma estes resultados. A Figura 2 mostra que os efeitos na formação de vasos sanguíneos, para o SC, apenas na concentração de 0,1 mg/disco resultaram em valores de D_{BC} e de D_{INF} significativamente diferentes do grupo controle com $p < 0,01$. Entretanto, o SC 0,03 mg/disco apresentou um aumento significativo na D_{BC} com $p < 0,05$. É importante notar que o efeito pró-angiogênico do FGF2 ($D_{BC} = 1.32 \pm 0.06$, $D_{INF} = 1.40 \pm 0.06$) foi semelhante à concentração mais elevada de SC administrada (0.1mg/disco, $D_{BC} = 1.23 \pm 0.04$, $D_{INF} = 1.34 \pm 0.04$).

Figura 1

Figura 2

As imagens eskeletonizadas e os valores das dimensões fractais do SG (0,001-0,1 mg/disco), FGF2 (50 ng/disco) e do grupos controle (veículo) na YSM são mostrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

A análise visual das imagens eskeletonizadas (Figura 3) indica que o SG, para todas as concentrações testadas, promoveu um aumento na quantidade de vasos vitelínicos em comparação com o grupo controle (veículo). Na Figura 4, observa-se um significativo aumento ($p < 0,01$) na quantidade de vasos vitelínicos, expresso em valores de D_{BC} , que variou de 1.18 ± 0.06 (0,001 mg SG/disco) para 1.28 ± 0.08 (0,1 mg SG/disco) e D_{INF} que variou de 1.27 ± 0.06 (0,001 mg SG/disco) para 1.39 ± 0.09 (0,1 mg SG/disco), em comparação ao grupo controle ($D_{BC} = 1.026 \pm 0.01$ e $D_{INF} = 1.13 \pm 0.01$). Além disso, o efeito pró-angiogênico do FGF2 foi semelhantes ao do SG nas concentrações que variaram de 0,01 a 0,1 mg/disco.

É possível notar que os efeitos promovidos pelo SG nos vasos vitelínicos foram qualitativamente semelhantes aos observados por SC. Apesar destes resultados, a atividade pró-vasculo/angiogênica do SG foi mais potente do que o SC (na concentração de 0,03 mg/implante; Fig. 1 A). Os resultados presentes na Fig. 4 demonstram que após dois dias de tratamento, o SG na concentração igual ou maior do que 0.001 mg/disco significativamente aumentou a rede vascular em relação ao grupo controle. Esta concentração (0.001 mg GS/ disco) foi em torno de 5 % mais potente do que a mesma dose do SC. Estes resultados sugerem que o processo de vasculo- e angiogênese na YSM em embriões de galinha podem ser modulados pelo SC e SG, exibindo resultados similares para aqueles encontrados para o conhecido fator de crescimento pró-angiogênico, FGF2. Os resultados também mostram que as dimensões fractais de D_{BC} e de D_{INF} foram adequados parâmetros para distinguir entre a rede vascular do grupo controle e tratado com SG e SC.

Figura 3

Figura 4

4. Discussão

A desregulação na angiogênese está associada ao crescimento de tumores e em doenças angioproliferativas (Folkman, 1995; Pandya *et al.*, 2006). No entanto, o estímulo farmacológico da angiogênese pode ser benéfico em situações clínicas na qual a ativação da angiogênese é terapeuticamente necessária, tais como na reparação de feridas e na isquemia (Detillieux *et al.*, 2003; Sarlon *et al.*, 2011). Diante do exposto, o presente estudo demonstra que tanto o SC como o SG promove a vasculogênese bem como a angiogênese embrionária, em vez de diminuir este processo, no ensaio da YSM em embriões de galinha. Em contraste com o "clássico" ensaio da CAM, o ensaio da YSM (Chapman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007) utilizado neste trabalho permite estudar os primeiros vasos vitelínicos (após a aplicação na YSM de discos contendo a substância em estudo) presentes no 2º dia de desenvolvimento embrionário do embrião de galinha (Dias *et al.*, 2008a, 2008b).

Os nossos resultados estão em conformidade com os resultados obtidos por Shepro (2006), que relataram que o SC induz efeitos pró-angiogênicos através da ligação ao fibrinogênio/fibrina, mediando uma melhoria sobre a migração de células endoteliais e invasão da matriz de fibrina, durante a cicatrização. Além disso, Tapon-Breaudière *et al.* (2000), em seus trabalhos com SC obtido do pepino do mar que possuía a mesma estrutura do SC de mamíferos, também demonstraram um potente efeito no aumento da proliferação e da migração de células endoteliais, na presença de

fatores de crescimento de ligação à heparina. Por outro lado, os nossos resultados contrastam com Liu *et al* (2005) que mostraram que o SC pode alternativamente exercer efeitos antiangiogênicos através da inibição da migração transendotelial de monócitos. E com o trabalho de Nagaoka *et al.* (2010), em estudos sobre a ação da glucosamina em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), que verificaram que esta substância inibe a ativação das células endoteliais *in vitro*, por meio da sua ação supressora na expressão da molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), resultando num efeito negativo sobre a adesão e migração destas células. Estudos anteriores têm revelado tanto efeitos estimulatórios como inibitórios de vários carboidratos sulfatados sobre o crescimento de diferentes células e na modulação da sinalização celular do FGF2, sendo sugerido que a razão está na estrutura química destas substâncias (Mundhenke *et al.*, 2002; Deepa *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007). Alguns trabalhos têm mostrado que os carboidratos sulfatados de origem endógena são essenciais para o transporte do FGF e ativação de seus receptores (FGFR), devido à formação de um complexo terciário entre o FGF2, seu receptor e moléculas com cadeias específicas de sulfato de heparana na superfície celular (Katz e Yamada, 1997; Gallagher, 1994; Miao *et al.*, 1997; Nugent e Iozzo, 2000). Entretanto, a capacidade de alguns carboidratos exibirem propriedades pró ou anti-vascular parece depender significativamente do grau de sulfatação. A atividade angiogênica de fucoïdanas nativas, sulfatadas em certo nível (Matou *et al.*, 2002), é perdida quando estas são super-sulfatadas. (Soeda *et al.*, 2000)

Vários métodos quantitativos e semiquantitativos têm sido descritos para avaliar a resposta produzida por estimuladores ou inibidores da angiogênese (Guidolin *et al.*, 2004). A análise fractal é mostrada como uma ferramenta adequada para detectar alterações em vários sistemas biológicos (Shulze *et al.*, 2008). Diversos estudos têm

utilizado a geometria fractal como uma ferramenta apropriada, capaz de descrever a formação de vasos sanguíneos em vários modelos animais, tais como, nos estudos do desenvolvimento da rede vascular na CAM do embrião de galinha (Kirchner *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 2003), na CAM do embrião de codorna (Parsons-Wingerter *et al.*, 1998), no embrião de *zebrafish* (Chan e Cheng, 2003), no córtex cerebral humano (Cassot *et al.*, 2006) e na retina humana (Kunick *et al.*, 2009).

Nós descrevemos um método de análise de imagem para estudar a atividade pró-angiogênica do SC e SG através do ensaio *in vivo* da YSM e a quantificação da rede vascular pelo uso da dimensão fractal. Os resultados obtidos através do uso desta ferramenta mostraram que as substâncias em estudo promovem o desenvolvimento da rede vascular primordial. O estímulo proporcionado pela concentração mais elevada de SC (0,1 mg/disco) e pelas concentrações de SG 0,01-0,1 mg/disco, quantificada por D_{BC} e D_{INF} , foi muito semelhante ao do conhecido efeito pró-vascular do FGF2 exógeno (50 ng/disco). Este fator de crescimento induz diferenciação *in situ* de células pluripotentes do blastodisco em embriões de galinha, ou pelo recrutamento de outras regiões da blastoderme, dando início a vasculogênese (Ruiter *et al.*, 1992).

Os nossos resultados indicam que a dimensão fractal (D_f) fornece um valor numérico sensível que caracteriza o desenvolvimento da rede capilar durante o processo de vasculogênese e angiogênese no ensaio da YSM. Os valores das D_f obtidos pelos dois métodos estudados sugerem que as duas abordagens descrevem aspectos semelhantes de aumento (ou redução) da complexidade da rede vascular, no entanto, também fornecem outras informações. Por exemplo, a D_f obtida pelo método de *box-counting* tem característica de filtro de baixa passagem (*low-pass filter*). Em outras palavras, quando o tamanho das caixas aumenta as partes mais

irregulares de uma imagem são progressivamente removidas, porém, as partes menores permanecem. Assim, a D_f calculada é uma média de toda a imagem (Chan e Cheng, 2003). Os valores altos da D_f nos grupos tratados com o SC e SG demonstram que a complexidade da vasculatura como um todo foi aumentada. Devido, a dimensão de *box-counting* não levar em conta a quantidade de pixels em cada caixa, neste estudo também foi estudado a dimensão de informação, como elemento que avalia o "peso" (quantidade de pixels) de cada caixa (Mendonça *et al.*, 2007). Assim, os valores mais elevados obtidos para os grupos tratados com SC e SG indicam que o "peso" (quantidade de vasos sanguíneos) aumentou.

Em conclusão, os valores de D_{BC} e D_{INF} demonstraram que o SC e o SG atuam como moduladores, estimulando os processos de vasculogênese e angiogênese na YSM de embriões de galinha. Este ensaio *in vivo* combinado com a análise fractal tem grande importância para os estudos voltados à caracterização de novas substâncias que possam ser utilizadas no controle de doenças associadas com a disfunção angiogênica. Estes estudos exigem não só um ensaio adequado, mas também uma quantificação precisa e objetiva dos quais o resultado da análise da dimensão fractal por meio da D_{BC} e D_{INF} puderam fornecer. No entanto, os mecanismos relacionados às ações pró-vasculogênica e angiogênica, necessitam ser caracterizados.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer as agências de fomento brasileiras CAPES, FACEPE e CNPq pelo suporte financeiro (bolsas).

Referências

Arciniegas, E., Parada, D., Graterol, A., 2003. Mechanically altered embryonic chicken endothelial cells change their phenotype to an epithelioid phenotype. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.*270, (1):67-81

Arlt, C., Schmid-Schönbein, H., Baumann, M., 2003. Measuring The Fractal Dimension Of The Microvascular Network Of The Chorioallantoic Membrane. *Fractals.*11, (2):205-212.

Asahara, T., Isner, J.M., 2002. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.*11:171–178.

Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.*9:653–660.

Cassot, F., Lauwers, F., Fouard, C., Prohaska, S., Lauwers-Cances, V., 2006. A novel three-dimensional computer-assisted method for a quantitative study of microvascular networks of the human cerebral cortex. *Microcirc.*13:1–18.

Chan, P.K, Cheng, S.H, 2003. Fractal analysis of vascular complexity in cadmium-treated zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.*63:83-87.

Chapman, S.C., Collignon, J., Schoenwolf, G.C., Lumsden, A., 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* 220:284–289.

Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., & Sugahara, K., 2004. Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.*279:37368–37376.

Detillieux, K.A., Sheikh, F., Kardami, E., Cattini, P.A., 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res.*57:8–19

Dias, P.F., Berti, F.V., Siqueira, J.M., Maraschin, M., A.G., Gagliardi A.R., Riveiro-do-Valle, R.M, 2008b. Trans-Resveratrol Inhibits Early Blood Vessel Formation (Vasculogenesis) Without Impairment of Embryonic Growth. *J Pharmacol Sci.*107:118–127.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Maraschin, M., Ferreira, A.G., Gagliardi, A.R., Riveiro-do-Valle, R.M., 2008a. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc Res.*75:34–44.

Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.*1:27–31.

Gabison, E., Chang, J.H., Javier, J., Lu Paul, C.S., Ye, H.Q., Kure, T., Kato, T., Azar, D.T., 2004. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res.*78:579-589.

Gallagher, J.T., 1994. Heparan sulphates as membrane receptors for the fibroblast growth factor. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*32:239–247.

Gimbrone, M.A.,1974. Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst.*52:413-427.

Guidolin, D., Vacca, A., Gastone, G., 2004. Nussdorfer, a and Domenico Ribattic, A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay in vitro. *Microvasc Res.*67:117–124.

Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B.B, Lindahl, U., Rapraeger, A.C., 1993. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF2, and FGF-4. *J Biol Chem.*268:23906-23914.

Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.*86:353–364.

Hisa, T., Kimura, Y., Takada, K., Suzuki, F., Takigawa, M., 1998. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro. *Anticancer Res.*18, (2A):783-790.

Iozzo, R.V., Sanderson, R.D., 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.*15, (5):1013-1031.

Jakob, W., Jentsch, K.D., Mauersberger, B., Heder, G., 1978. The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. *Exp Pathol.*15:241–249.

Katz, B.Z., Yamada, K.M., 1997. Integrins in morphogenesis and signaling. *Biochimie.*79:467–476.

Kirchner, L.M., Schmidt, S.P., Gruber, B.S, 1996. Quantitation of Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane Model Using Fractal Analysis. *Microvasc Res.*51:2–14.

Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.*42:930-934.

Li, Y.J., Duan, C.L., Liu, J.X., Xu, Y.G., 2010. Pro-angiogenic actions of Salvianolic acids on in vitro cultured endothelial progenitor cells and chick embryo chorioallantoic membrane model. *J Ethnopharmacol.*131, (3):562-566.

Liu, L., Yu, Q., Lin, J., Lai, X., Cao, W., Du, K., Wang, Y., Wu, K., Hu, Y., Zhang, L., Xiao, H., Duan, Y., Huang, H., 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for

hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.*20, (11):1961-1971.

Liu, Y., Yang, H., Otaka, K., Takatsuki, H., Sakanishi, A., 2005. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chondroitin sulfate A on human monocytic THP-1 cell migration. *Colloid Surf B.*43:216–220.

Ma, L., Rudert, W., Harnaha, J., Wright, M., Machen, J., Lakomy, R., Qian, S., Lu, L., Robbins, P.D., Trucco, M., Giannoukakis, N., 2001. Immunosuppressive effects of glucosamine. *J. Biol. Chem.*277:39343-39349.

Miao, H., Ornitz, D.M., Aingorn, E., Ben-Sasson, S.A., Vlodavsky, I., 1997. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, dimerization, signaling, and angiogenic activity by a synthetic heparin-mimicking polyanionic compound. *J. Clin. Invest.*99:1565–1575.

Matou, S., Helly, D., Chabut, D., Bros, A., Fischer, A.-M., 2002. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.*106:213–221.

McCormick, J.F., Nassauer, J., Bielunas, J., Leighton, J., 1984. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. *Scan. Electron. Microsc.*4:2023–2030.

Mendonça, M.B.M., Garcia, C.A.A., Nogueira, R.A., Gomes, M.A.F., Valença, M.M., Oréface, F., 2007. Fractal analysis of retinal vascular tree: segmentation and estimation methods. *Arq Bras Oftalmol.*70, (3):413-422.

Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., Friedl, A., 2002. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am. J. Pathol.*160:185–194.

Nagaoka, I., Igarashi, M., Hua, J., Ju, Y., Yomogida, S., Sakamoto, K., 2011. Recent aspects of the anti-inflammatory actions of glucosamine. *Carbohydr Polym.*84:825-830.

Nguyen, M., Shing, Y., Folkman, J., 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis. In the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res.*47:31–40.

Nugent, M.A., Iozzo, R.V., 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.*32:115–120.

Pandya, N.M., Dhalla, N.S., Santani, D.D., 2006. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol.*44, (5):265-274.

Parsons-Wingenter, P., Lwai, B., Yang, M.C., Elliott, K.E., Milaninia, A., Redlitz, A., Clark, J.I., Helene Sage, E., 1998. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bfgf and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc. Res.*55:201–214.

Peek, M.J., Norman, C., Markhan, R., Frases, I.S., 1988. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. *Exp. Pathol.*34, (1):35–40.

Poveshchenko, A.F., Konenkov, V.I., 2010. Mechanisms and factors of angiogenesis. *Usp Fiziol Nauk.*41, (2):68-89.

Qiao, D., Meyer, K., Mundhenke, C., Drew, S. A., Friedl, A., 2003. Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Brain Endothelial Cells. *J Biol Chem.*278:16045–16053.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P.H., Djonov, V., 2001. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec.*264:317-324.

Ruiter, M.C., Poelmann, E.D., Mentink, M.M.T., Vaniperen, L., Gittenberger-de-Groot, A.C., 1992. The early formation of the vascular system in quail embryos. In: Ruiter MC, editor. *Development of the vascular system in the embryo. A concept of the origin of systemic-pulmonary collateral arteries.* The Netherlands: Leiden Univ Bibl. p. 99–186.

Saito, A., Munakata, H., 2004. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. *Electrophoresis.*25:2452–2460.

Sarlon, G., Zemani, F., David, L., Duong Van Huyen, J.P., Dizier, B., Grelac, F., Collic-Jouault, S., Galy-Fauroux, I., Bruneval, P., Fischer, A.M., Emmerich, J., Boisson-Vidal, C., 2011. Therapeutic Effect of Fucoidan-Stimulated Endothelial Colony-Forming Cells in Peripheralschemia. *J Thromb Haemost.* Accepted manuscript online: 8 NOV 2011 10:02AM EST

Schulze, M.M., Hutchings, N., Simpson, T.L., 2008. The use fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. *IOVS* 49:1398-1406.

Shepro, D., 2006. *Microvasc Research.* Editora Elsevier, 1187 p.

Smith, S. M. L., West, L. A., Govindraj, P., Zhang, X. D., Ornitz, M., Hassel, J. R., 2007. Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF2 to FGF receptors. *Matrix Biol.*3:175–184.

Soeda, S., Kosako, T., Iwata, K., Shimeno, H., 2000. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.*1497:127–134.

Sologub, A.A., Akberova, S.I., Ziangirova, G.G., 1992. Emoxipin as an inhibitor of angiogenesis. *Biull Eksp Biol Med.*114, (12):620-622.

Stringer, S.E., 2006. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem Soc Trans.*34:451-453.

Tamilarasan, K.P., Kolluru, G.K., Rajaram, M., Indhumathy, M., Saranya, R., Chatterjee, S., 2006. Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC Cell Biol.*7:17.

Tapon-Bretheadie`re, J., Drouet, B., Matou, S., Mourão, P.A.S., Bros, A., Fischer, A.M., 2000. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb. Haemostasis.*84:332–337.

Tongers, J., Roncalli, J.G., Losordo, D.W., 2010. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res.*79, (3):200-206.

Tufan, A.C., Satiroglu-Tufan, N.L., 2005. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets.*5:249-266.

Vu, M.T., Smith, C.F., Burger, P.C., Klintworth, G.K., 1985. An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. *Lab Invest.*53:499–508.

Wang, H.M., Lu, C.Y., Wang, X.H., Bao, Y.L., Meng, X.Y., Wu, Y., Li, Y.X., 2007. Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model. *J Biol Res.*7:93–97.

Yip, G.W., Smollich, M., Götte, M., 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther.*5:2139-2148.

Young, P.P., Vaughan, D.E., Hatzopoulos, A.K., 2007. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis.*49, (6):421-429.

Zammaretti, P., Zisch, A.H., 2005. Adult endothelial progenitor cells renewing vasculature. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*37, (3):493–503.

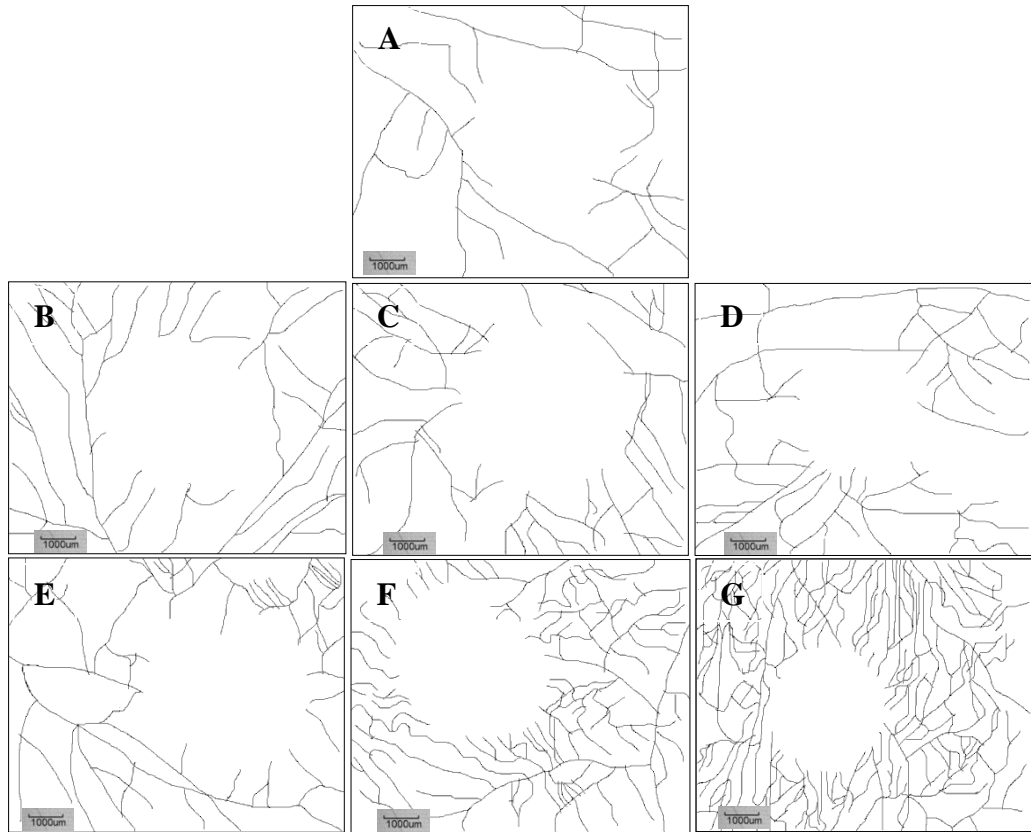


Figura 1. Imagens esqueletonizadas (imagem de fundo branco e vasos em preto) da rede vascular da YSM após o implante dos discos de metilcelulose contendo diferentes substâncias. A: Controle Negativo (água, veículo); B: SC, 0,001 mg/disco; C: SC, 0,003 mg/disco; D: SC, 0,01 mg/disco; E: SC, 0,03 mg/disco. F: SC, 0,1 mg/disco. G: FGF2 (controle positivo). Ampliação final: X20 (barras: 1000 μ m)

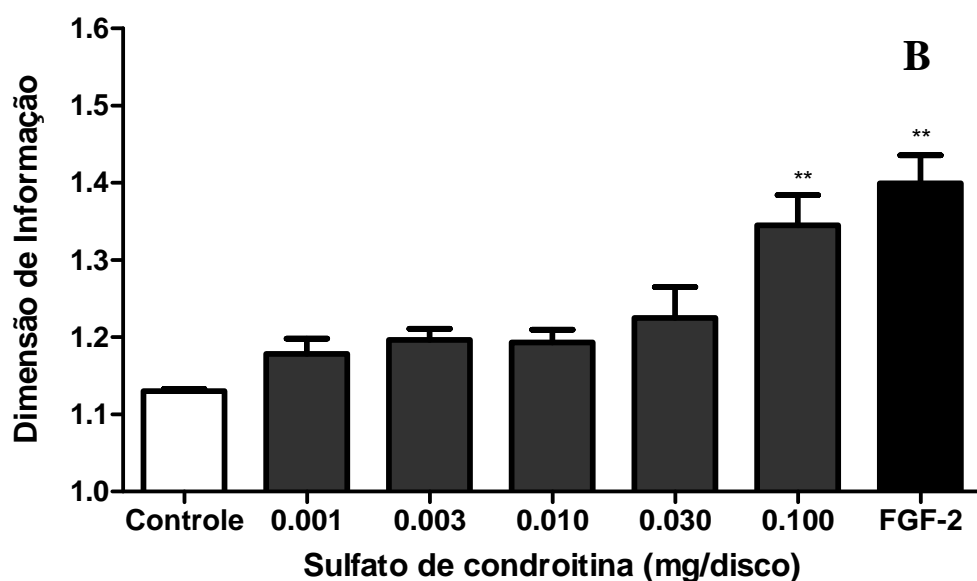
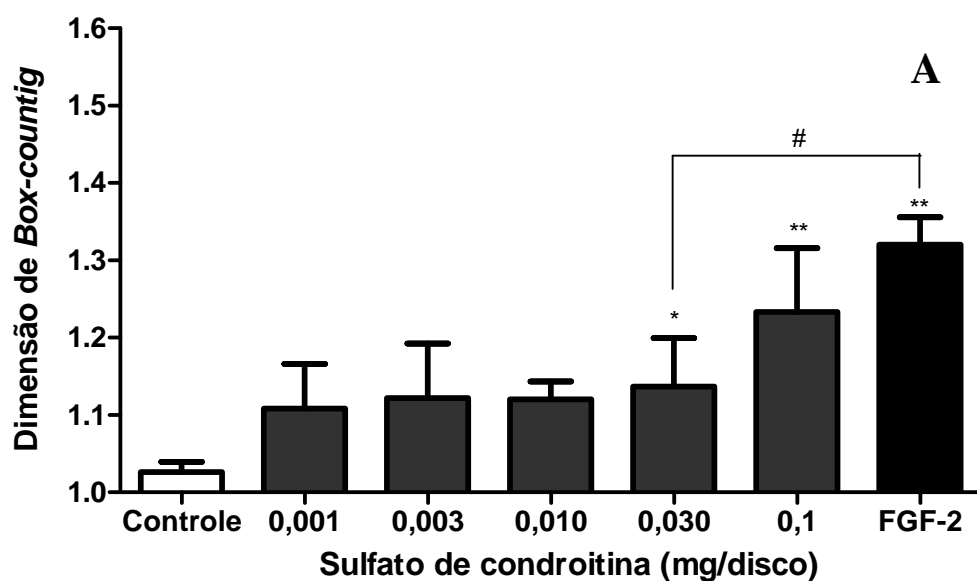


Figura 2. Efeito estimulatório do SC (0.001-0.1 mg/disco) na vascularização da YSM no 4º dia. Os resultados foram quantificados, por imagens esqueletonizadas, das dimensões fractais de (A) *Box-counting* (D_{BC}) e de (B) informação (D_{INF}). Os controles foram realizados com veículo (água, controle negativo) e FGF2 (50 ng/disco, controle positivo). Cada barra representa a média \pm SEM de seis ovos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs o controle negativo; # $p < 0.01$ vs FGF2 (ANOVA e Tukey como teste de *post hoc*).

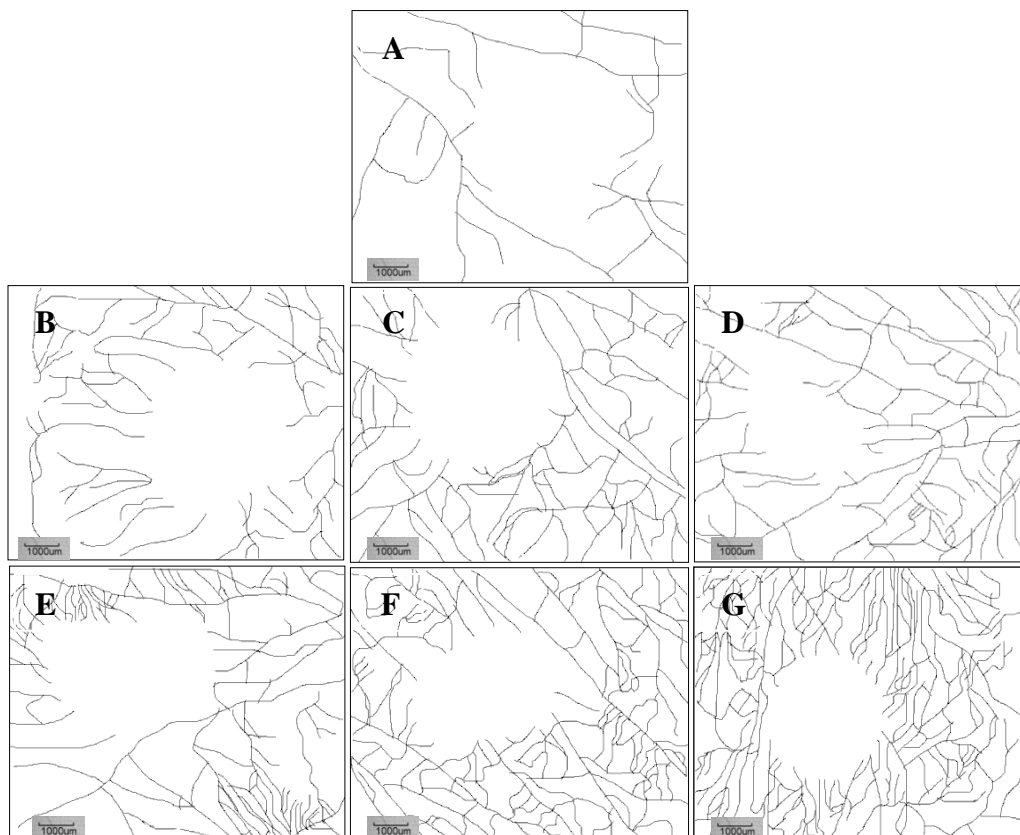


Figura 3. Imagens esqueletronizadas (imagem de fundo branco e vasos em preto) da rede vascular da YSM após o implante dos discos de metilcelulose contendo diferentes substâncias. A: Controle Negativo (água, veículo); B: SG, 0.001 mg/disco; C: SG, 0.003 mg/disco; D: SG, 0.01 mg/disco; E: SG, 0.03 mg/disco. F: SG, 0.1 mg/disco; G: FGF2 (controle positivo). Ampliação final: X20 (barras: 1000 μ m).

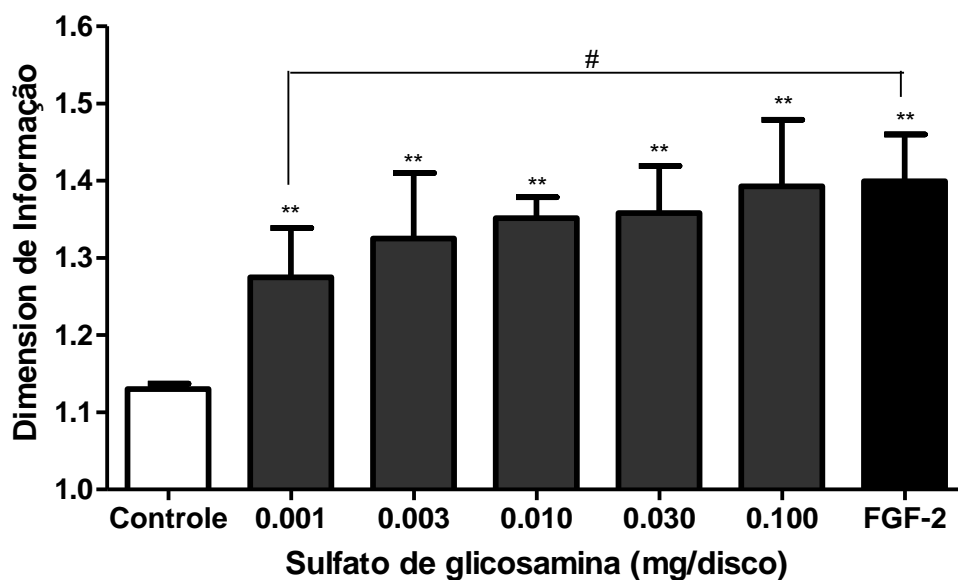
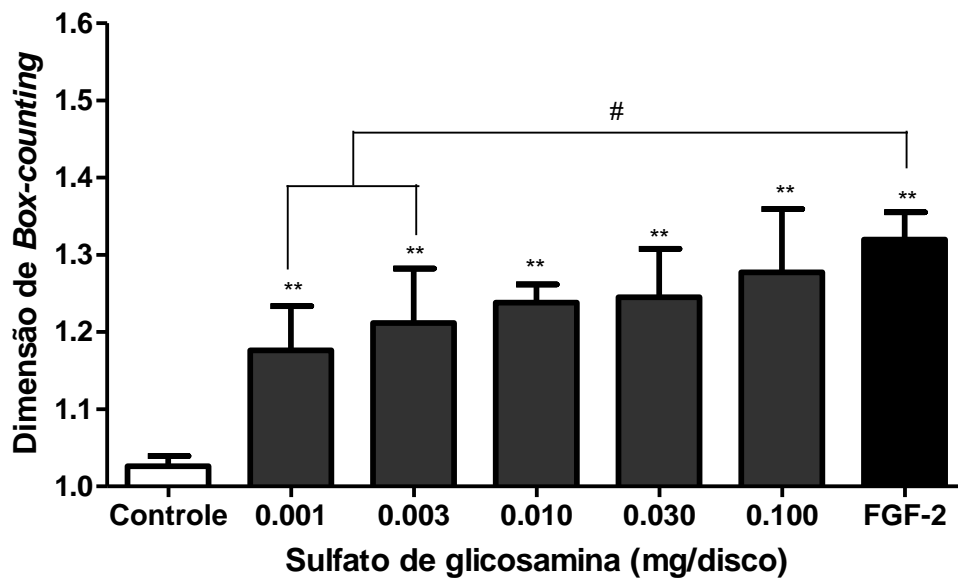


Figura 4. Efeito estimulatório do SG (0.001-0.1 mg/disco) na vascularização da YSM no 4º dia. Os resultados foram quantificados, por imagens esqueletonizadas, das dimensões fractais de (A) *Box-counting* (D_{BC}) e de (B) informação (D_{INF}). Os controles foram realizados com veículo (água, controle negativo) e FGF2 (50 ng/disco, controle positivo). Cada barra representa a média \pm SEM de seis ovos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs o controle negativo; # $p < 0.01$ vs FGF2 (ANOVA e Tukey como teste de *post hoc*).

5. CAPÍTULO II

Artigo submetido a revista *Microvascular Research*

Propriedades pró-angiogênicas do sulfato de condroitina e sulfato de glucosamina: um estudo comparativo *in vitro* e *in vivo*.

Fernanda Katharine de Souza Lins Borba^{1,2}, Daniela Sousa Coelho², Viviane Aparecida Balvedi Polli², Paulo Fernando Dias², Romildo Albuquerque Nogueira^{1*}

¹Laboratório de Biofísica Teórico, Experimental e Computacional, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Brasil.

²Laboratório de Estudos em Embrioatividade e Morfogênese Animal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, Florianópolis, Brasil

Autor para correspondência: R. A. Nogueira: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, Email: ran.pe@terra.com

Resumo

Duas substâncias, naturalmente presentes na matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular, o sulfato de condroitina (SC) e o sulfato de glucosamina (SG), foram avaliadas quanto aos seus efeitos pró-angiogênicos *in vitro*, em ensaios de viabilidade, proliferação e diferenciação (tubulogênese em Matrigel®) de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), bem como em ensaios *in vivo* realizados em modelos de embriões de galinha e de camundongos adultos. Verificou-se que, *in vitro* o SC (3 µg/mL), mas não o SG, estimulou significativamente a proliferação de HUVEC (40%) e diferenciação (64%) em comparação com o controle (meio RPMI-1640 apenas como veículo). Esses efeitos nas HUVEC não foram estatisticamente diferentes do que foi proporcionado (28% e 53%, respectivamente) pela administração de 50 ng/mL de FGF2, um conhecido estimulador angiogênico. A atividade angiogênica *in vivo* do SC e SG foi avaliada no ensaio da membrana corioalantóide (CAM) por meio da análise fractal. Neste ensaio, realizado na CAM de embriões de galinha com 8 dias de idade, o SC e o SG aumentaram o número de vasos sanguíneos apenas na maior concentração testada (2 mg/disco) em relação ao controle (água em discos de metilcelulose). A ação pró-angiogênica promovida pelo SC (2 mg/disco) durante o desenvolvimento embrionário da galinha foi reproduzida sobre a angiogênese avançada na região subcutânea em camundongos Swiss adultos, obtido através do ensaio dos implantes (esponjas) de Gelfoam® nesta região. Os grupos tratados com SC (2 mg/implante; esponja de Gelfoam) exibiram um aumento no número de vasos no interior dessas esponjas (0,52 ± 0.08g/dL; medida da esponja - teor de hemoglobina). Esse efeito angiogênico foi bastante similar ao promovido no tratamento com o FGF2 (50 ng/implante), implantado na região s.c. em camundongos (0,53 ± 0.1 g/dL). No entanto, o

tratamento realizado com o SG (2 mg/implante), implantando nesta mesma região em camundongos adultos, não apresentou efeito. De acordo com os resultados obtidos, o SC promoveu um aumento na proliferação e na tubulogênese em culturas *in vitro* de HUVEC e induziu respostas angiogênicas *in vivo*, tanto na CAM de embriões de galinha, quanto na região s.c. de camundongos adultos, sem sinais evidentes de toxicidade. Dessa forma, nós sugerimos que SG e o SC (principalmente) exercem efeitos pró-angiogênicos devido à semelhança bioquímicas de seus constituintes aos da MEC, podendo ser utilizados em situações clínicas, na qual exista um suprimento e/ou crescimento ineficientes de vasos, tal como, na isquemia e na cicatrização. No entanto, devido às propriedades relatadas, os riscos que envolvem seu uso no tratamento de doenças que exigem modulação terapêutica da angiogênese devem, talvez, ser repensadas. Por outro lado, um estudo mais detalhado dos mecanismos envolvidos nas ações do SC e do SG devem ser elucidados nos próximos trabalhos.

Palavras-chave: Sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina, angiogênese, Fractal, matrigel, HUVEC

Introdução

A formação de vasos sanguíneos pode envolver diferentes processos, dependendo da idade e condições dos tecidos (por exemplo), e são mediadas por um grande número de proteínas, incluindo moléculas de adesão celular, componentes da matriz extracelular (MEC), proteases, etc (Bischoff, 1995; Carmeliet, 2003). Análises genéticas realizadas nos últimos anos renderam importantes descobertas sobre os mecanismos moleculares e celulares relacionados à formação de vasos sanguíneos (Carmeliet e Collen, 1997; Darland e D'Amore, 1999, 2001; Davis *et al.*, 2011, Murakami, 2012). A angiogênese é o processo mais conhecido de formação de vasos. O termo angiogênese refere-se ao surgimento de capilares pré-existentes e agora é usado na embriologia para descrever os processos de complexo crescimento e remodelação vascular que transformam os vasos primordiais numa rede vascular madura. As células endoteliais dos vasos sanguíneos, embrionárias e pós-nascimento, proliferam e podem permanecer quiescentes por vários anos. No organismo adulto, a formação de novos vasos sanguíneos é rigidamente controlada e ocorre apenas em certas condições fisiológicas e patológicas tais como na gravidez, retinopatia diabética ou no crescimento dos tumores (Bergers e Benjamin, 2003; Zammarettia e Zischia, 2005). Devido ao fato da angiogênese ser um processo crucial no desenvolvimento de muitos tumores, bem como em distúrbios não neoplásicos, essas doenças são também referidas como doenças angiogênicas e, nas últimas décadas, alguns estudos têm se concentrando nas propriedades terapêuticas dos agentes antiangiogênicos (para revisão, ver Folkman, 2007). Em outro contexto, trabalhos têm sugerido que o estímulo da angiogênese por fármacos pode ser utilizado para acelerar o processo de cicatrização e para promover o

crescimento de vasos sanguíneos em tecidos isquêmicos (Heilmann *et al.*, 2002; Detillieux *et al.*, 2003; Matou *et al.*, 2005).

A angiogênese é estimulada por um grande número de fatores de crescimento, incluindo particularmente o fator de crescimento de fibroblastos - 2 (FGF2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O FGF2 é liberado principalmente por células lesadas nas feridas (Arciniegas *et al.*, 2003). A produção de VEGF é regulada em condições de hipóxia, tais como aquelas encontradas em tecidos isquêmicos (Liu *et al.*, 2011). O FGF2 e VEGF exercem atividade pró-angiogênica em modelos animais e *in vitro* (Asahara *et al.*, 1995; Mitsunobu *et al.*, 2005; Bahramsoltani *et al.*, 2010). Em resposta a fatores de crescimento angiogênicos, células endoteliais degradam a membrana basal do vaso principal, migram em torno da matriz intersticial em direção ao estímulo angiogênico, proliferam para o surgimento de novos vasos sanguíneos, e se diferenciam em túbulos vasculares (Marti e Risau, 1999; Ambler *et al.*, 2003). Alguns componentes da matriz extracelular, tais como laminina, colágeno e fibronectina, também regulam as funções das células endoteliais (invasão, migração, proliferação e diferenciação) via integrinas - proteínas da superfície celular, cuja expressão pode ser induzida por fatores de crescimento angiogênicos (Iivanainen *et al.*, 2003).

Os efeitos angiogênicos do FGF2 e VEGF, que pertencem à família dos fatores de crescimento de ligação a heparina, podem ser modulados por polissacarídeos sulfatados (Soker *et al.*, 1994; Rusnati *et al.*, 1996; Burgmeister *et al.*, 2002; Matou *et al.*, 2005; Harmer, 2006). O FGF2 possui uma alta afinidade pelos glicosaminoglicanos (GAG) de sulfato de heparana (HS) e heparina, e quando ligados covalentemente às proteínas do núcleo, podem formar proteoglicanas HS (HSPG). De fato, as HSPG, encontrada na membrana, foram caracterizadas como

sítios de ligação de baixa afinidade para os FGF que não transmitem um sinal biológico, mas, possuem a função de moléculas acessórias que regulam a ligação do FGF e a ativação de seus receptores (Yayon *et al.*, 1991; Nugent e Iozzo, 2000). A sua remoção da superfície celular prejudica a atividade biológica deste fator de crescimento (Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991). Em alguns casos as HSPG encontradas na matriz extracelular atuam como substituto destas presentes na membrana e auxiliam a ligação do FGF2 no seu receptor (Aviezer *et al.*, 1997; Delehede *et al.*, 1996). Estes polissacarídeos, também, podem potencializar as atividades angiogênicas dos fatores de crescimento, ligando-se a eles como dito anteriormente e protegendo-os da degradação enzimática, promovendo assim a dimerização do receptor de tirosina-quinase (Tardieu *et al.*, 1992; Fannon *et al.*, 2000).

Além da heparina e do HS altamente sulfatado, alguns outros polissacarídeos sulfatados podem influenciar o crescimento celular endotelial vascular (Stringer, 2006; Iozzo e Sanderson, 2011). O sulfato de condroitina (SC) é um GAG, e o sulfato de glucosamina (SG) é um amino-monossacarídeo componente de GAG, que estão naturalmente presentes na matriz extracelular da cartilagem articular (Crolle e D'Este, 1980; Fioravanti e Collodel, 2006). Terapeuticamente, estas duas moléculas sulfatadas vêm sendo utilizadas juntas no tratamento da osteoartrite e em doenças cardiovasculares em modelos humanos e animais (Ma *et al.*, 2002; Saito e Munakata, 2004). Devido às suas propriedades bioquímicas e semelhanças com os componentes da matriz extracelular, a hipótese é que o SC e o SG, compostos com composição semelhante ao HS (Yip *et al.*, 2006), possam ser moduladores eficazes da angiogênese. Alguns estudos tem sugerido que proteoglicanas contendo SC (CSPG) participam na sinalização do FGF2 (Bao *et al.*, 2004; Molteni *et al.*, 1999;

Smith *et al.*, 2007). O CSPG modula a ligação do FGF2 ao FGFR, seja como sítios de ligação de baixa afinidade (Smith *et al.*, 2007) ou em cooperação com cadeiras do HS (Deepa *et al.*, 2004). Portanto, a estrutura química de ambos, HS e SC, podem modular a ligação do FGF2 e ativação do FGFR em célula específicas (Nikitovic *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos têm utilizado diferentes estratégias como os tratamentos pré-clínicos farmacológicos na promoção da angiogênese. Buscando avaliar a possível ação do SC e SG no surgimento de novos vasos sanguíneos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do SC e do SG, na presença e na ausência do FGF2, no estímulo a angiogênese em modelos (1) *in vivo* na CAM de embriões *Gallus domesticus*, (2) na angiogênese avançada em camundongos (*Mus musculus*) adultos (3) *in vitro* em célula da linhagem HUVEC na viabilidade, proliferação e no ensaio de tubulogênese vascular endotelial em suporte de Matrigel® na presença e ausência de FGF2.

Materiais e Métodos

Materiais

O SC e SG utilizado nestes experimentos foram gentilmente cedidos pela empresa Phytomare® (Governador Celso Ramos, SC, Brasil) com pureza superior a 90%.

Ensaio de viabilidade celular

As HUVEC foram semeadas (5.0×10^6 células/poço) em meio RPMI-1640 em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com concentrações crescentes de SC, SG e ou ambos (1–3000 mg/poço; 200 µL de volume por poço). O meio foi removido após 3 dias e os poços foram cuidadosamente lavados várias

vezes com PBS (100 µL/poço) para remover quaisquer compostos remanescentes antes de realizar o ensaio do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (Carmichael et al., 1987). O meio RPMI-1640 foi adicionado à solução de MTT (5 mg/mL em PBS) a uma razão de solução de MTT para o meio de cultura de 1:10. Após a incubação, numa atmosfera umidificada contendo 5% CO₂ a 37°C durante 4 h, o meio foi aspirado dos poços e 200 µL de solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço para dissolver o precipitado - cristais de formazan; as placas foram agitadas num agitador de placas durante 5 min. A absorbância em 540 nm foi então determinada usando um leitor de ELISA automático (Spectra & Rainbow Readers, Tecan). Os resultados foram expressos em percentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Proliferação celular

Uma suspensão de células da linhagem HUVEC (20 x 10³ células/poço), mantidas em meio RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino (FBS), foi adicionada em placas de 24 poços pré-revestidas com lamínulas circulares (Glasscyto®) previamente flambados. No dia seguinte, o meio foi substituído com o SC ou SG (3, 30 e 300 µg/ml; 300 µl de volume por poço), isoladamente ou em associação com o FGF2 (50 ng/mL). O meio de cultura e o FGF2 (50 ng/mL em meio de cultura) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. Após os tratamentos as placas foram incubadas durante 72h. A incorporação do análogo da timidina, 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU), no DNA, serviu como um índice da proliferação celular, a qual foi incorporada 4h antes da leitura imunocitoquímica (diluição de trabalho: 1:100). As células foram então fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 min, e posteriormente lavadas 3 vezes em intervalos de 5 min em

PBS com 0,25% de Tween 20. Após a lavagem, as células foram incubadas duas vezes com HCl 2N a 37 °C (15 min cada). A seguir, todos os outros passos foram realizados a temperatura ambiente (25°C ± 2 °C). As células foram permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 durante 30 min, e bloqueadas durante 40 min com uma solução contendo 5% de FBS e 0,5% de soro normal de cabra. Em seguida, foram incubadas durante 2 hs em solução de anticorpo primário contendo anti-BrdU (Chemicon, MAB 3222), diluído de 1:200. Após a lavagem, as células foram incubadas durante 1h no escuro, com Alexa Fluor 488 - anticorpo secundário conjugado anti-cabra (FITC, Chemicon AP124F, diluído 1:100), e subsequentemente lavadas e incubadas com DAPI (1:1000) durante 30 segundos. As lamínulas com BrdU e DAPI foram montadas sobre laminas contendo Prolong Gold, e examinadas com objetiva de 10X em um microscópio de fluorescência (Olympus, BX41) equipado com sistema de filtro para fluoresceína (Alexa Fluor 488, a absorção: 494nm e emissão: 517nm) e DAPI (absorção: 345nm e emissão: 455nm). Fotomicrografias digitais foram obtidos a partir de cinco campos aleatórios utilizando a câmara (Q-imaging 3.3) e o programa Q-capture Pro 5.1. Os Campos visuais assim fotografados foram armazenados na forma digital e analisados por contagem manual dos núcleos corados. A proliferação das células endoteliais foi avaliada através da quantificação da proporção de células que tinham incorporado BrdU dos grupos controle e tratado, e os resultados expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos.

Ensaio de tubulogênese endotelial

O ensaio de tubulogênese foi utilizado para investigar o efeito do SC e do SG na angiogênese *in vitro*. Em resumo, uma placa de 96 poços foi revestida com 50µl de

matrigel líquido por poço, e gelificado a 37 °C durante 50 min. Posteriormente as HUVEC foram semeadas a uma densidade de 15×10^3 células num volume de meio RPMI-1640 de 50 µL/poço, e mantida durante 2 hs a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 150µl de meio de cultura contendo concentrações crescentes de SC e SG (3, 30 e 300 ug/ml), isoladamente ou em associação com FGF2 (50 ng/mL). O veículo (apenas meio) e FGF2 (50 ng/mL em meio) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% CO₂ (suficiente para a formação de uma rede em forma de túbulos). Os túbulos vasculares fechados foram contados por meio da utilização de um microscópio de luz invertida, com ampliação de 25x. No entanto, túbulos incompletos foram excluídos da contagem. Para cada poço foram escolhidos três campo aleatórios para contagem do número de túbulos, como descrito por Liao *et al.* (2003). Os dados foram expressos como uma percentagem do número de microtubos relacionados ao controle.

Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss, isentos de agentes patogénicos específicos, com 2 meses de idade, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil) e mantidos em uma sala com controle de luz (aceso das 7:00 A.M. às 7:00 P.M.) a uma temperatura ambiente de 24 ± 1 °C e alimentados com ração animal, esterilizada e água *ad libitum*.

Os ovos de galinha fertilizados (linhagem Ross, n = 6), livres de patógenos, foram fornecidos por uma empresa avícola (Tyson S.A., SC, Brasil).

Todos os estudos com animais foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no número de protocolo PP00586/2011/CEUA/UFSC, aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil).

Ensaio da CAM

A capacidade do SC e SG em estimular a vasculogênese e angiogênese foi determinada pelo ensaio da membrana corioalantóide (CAM), realizados de acordo com o método apresentado por Dias *et al.* (2008). Os ovos de galinha fertilizados foram inicialmente incubados a 37,5 °C com 70% de umidade relativa. Após 48 hs, os ovos foram removidos da incubadora, e uma janela (10 mm de diâmetro) foi aberta na casca do ovo, numa posição adjacente ao embrião. O tratamento *in ovo* foi realizado através da implantação de suportes em forma de disco de metilcelulose (7,5 de volume μL , diâmetro de 3 mm; um disco por embrião) adsorvidos com SC, SG e FGF2 (controle positivo), numa região próxima ao embrião, com seis dias de desenvolvimento, onde os capilares sanguíneos estavam proliferando. Após estas manipulações as janelas foram fechadas com fita isolante e os ovos foram devolvidos à incubadora até o 8º dia (E8 dia embrionário). As concentrações de SC e SG administrada às membranas vasculares, por meio do disco de metilcelulose variaram de 0,02 a 2,00 mg/disco. Discos contendo o FGF2 (50 ng/disco) e discos de metilcelulose (água ultrafiltrada como solvente; pH 7,2) foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Para cada ovo, as imagens foram capturadas com uma câmera Motic 1000 de 1.3 MP acoplada a um microscópio estereoscópico (20x). Os vasos da região próxima aos discos de metilcelulose foram quantificados através do cálculo da dimensão fractal.

Segmentação das imagens

As imagens digitais foram processadas para calcular a dimensão fractal da rede vascular da CAM como a seguir. Primeiro, as imagens foram segmentadas manualmente usando o Microsoft® Paint para separar os vasos sanguíneos do restante das imagens. Cada vaso foi traçado por uma linha com espessura de um pixel, após este procedimento as imagens foram binarizadas (fundo em preto e os vasos em branco), usando o mesmo programa. Por fim, o software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System foi utilizado para calcular as dimensões fractais dos vasos sanguíneos.

Análise fractal

O método utilizado para calcular a dimensão fractal foi a Dimensão de *Box-Counting* (D_{BC}). O cálculo da D_{BC} foi realizado pelo Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System. Na D_{BC} o objeto fractal em estudo é coberto com $N(r)$ caixas de tamanhos diferentes em escala decrescente e é contado o número de caixas que contém ao menos um ponto (pixel) da estrutura analisada. Após esse procedimento, traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função dos lados das caixas r (KUNICKI et al., 2009). A inclinação desse gráfico é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente através da seguinte expressão:

$$D_{BC} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \epsilon) - \log N(r)}{\log(r + \epsilon) - \log(r)} \right]$$

Ensaio dos implantes de Gelfoam

Para avaliar a formação de vasos sanguíneos em adultos, camundongos Swiss de 8 semanas de idade com um peso corporal médio de 27 ± 2 g foram utilizados. Os grupos foram tratados com o SC ou SG (2 mg/animal), FGF2 (50 ng/animal), isoladamente ou em associação. PBS, como veículo, e FGF2 (50 ng/animal) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Cada composto ou combinação foi adsorvido (50 μ L) em um implante de esponja de gelatina estéril (Gelfoam® 6mm de diâmetro x 3mm). Cada esponja de Gelfoam foi implantada por via subcutânea (s.c.) no flanco traseiro direito do camundongo (n = 5 - 8). Os camundongos foram sacrificados após duas semanas, por inalação com CO₂ e a pele foi cuidadosamente retirada para expor as esponjas de Gelfoam intactas. A quantidade de hemoglobina (Hb) no interior das esponjas de Gelfoam foi medida utilizando o reagente Drabkin, como um quantificador da formação de vasos sanguíneos (Drabkin *et al.*, 1932). A concentração de Hb foi expressa em miligramas por decilitro e calculada com base em um padrão de Hb medido simultaneamente utilizando a seguinte equação: absorvância da amostra/absorvância do padrão x10, como descrito por Lee *et al.* (2003) e Dias *et al.* (2005).

Análise estatística

Os dados estão representados como média \pm S.E.M. obtido a partir de pelo menos dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e posteriormente foi realizado o teste “*post hoc*” de Tukey. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram menores que 0,05.

Resultados

Efeitos do SC e SG na viabilidade celular *in vitro*

Para investigar a ação dos SC e SG na angiogênese, primeiramente foi investigado o efeito de concentrações crescentes de SC e SG apenas, bem como em combinação (3-3.000 $\mu\text{g/ml}$) na viabilidade celular de HUVEC através do ensaio de toxicidade pelo MTT. Como demonstrado na Figura 1, após um tratamento com duração de 48 hs, os resultados obtidos mostram que a viabilidade das HUVEC não foi significativamente alterada pelos tratamentos com o SC e SG apenas e SC + SG no intervalo entre 1-10 $\mu\text{g/ml}$. No entanto, quando houve um aumento nas concentrações dos tratamentos com SC, SG apenas e CS + GS de 30 para 3000 $\mu\text{g/ml}$, foi observado uma redução na viabilidade das HUVEC. No intervalo de concentração entre 30-300 $\mu\text{g/mL}$, o SC e SG reduziram, respectivamente, a viabilidade celular para $66 \pm 1.2 - 65 \pm 2.5\%$ e $60 \pm 2.41 - 57 \pm 2.5\%$ em relação ao controle ($p < 0,05$). E no maior intervalo testado (1000-3000 $\mu\text{g/mL}$) o SC reduziu a viabilidade de células HUVEC em $62 \pm 2.6 - 53 \pm 2.9\%$ enquanto o SG, no mesmo intervalo, reduziu em $45 \pm 2.3 - 36 \pm 1.8\%$ (Figura 1). De acordo com a Figura 1 pode-se observar que não houve efeito de somação na administração concomitante do SC e SG em todas as concentrações testadas, ou seja, a associação do SC com o SG não mostrou diferenças significativas, quando comparados ao SC e SG individualmente. Dessa forma, curiosamente, o tratamento de coadministração foi menos potente, pois a quantidade de células viáveis foram significativamente reduzidas apenas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente três vezes maior que a necessária para reduzir a viabilidade nos tratamentos com SC e SG isoladamente).

Figura 1

Proliferação de HUVEC por BrdU

Posteriormente, foi investigado o efeito do SC e SG na proliferação de HUVEC por meio da marcação com o BrdU, e o ensaio de tubulogênese em suporte de Matrigel. Na reação imunocitoquímica utilizando-se BrdU, as células consideradas positivas, marcada pelo BrdU, apresentam após a radiação ultravioleta, coloração com verde. Como mostrado na Figura 2 A e B, a proliferação de HUVEC foi aumentada para 40% com SC (3 $\mu\text{g/mL}$) e 50% com o FGF2 quando comparados ao controle ($p < 0,05$), sugerindo que este aumento da síntese de DNA pode ter uma contribuição significativa no aumento do crescimento celular da HUVEC favorecido pelo SC. No entanto, com concentrações maiores que 3 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu uma redução no número de células proliferativas, as quais não diferiram significativamente do controle ($p < 0,05$). O SC usado combinado com FGF2 não possuiu efeito na proliferação de HUVEC (Figura 2 B). Comparado ao controle, o SG apenas não teve efeito na proliferação celular, mas o SG (300 $\mu\text{g/mL}$) + FGF2 reduziu a proliferação de HUVEC para 42% ($p < 0.01$).

Figura 2

Formação túbulos vasculares por HUVEC em Matrigel

De forma a avaliar o efeito do SC e SG na diferenciação em HUVEC, estas células foram tratadas nas concentrações de SC e SG de 3, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h em suporte matrigel. Quando plaqueadas em Matrigel, as HUVEC se reorganizam de forma rápida e posteriormente formam uma rede de túbulos vasculares. Essa

formação de estruturas ramificadas foi observada no controle (Figura 3). As HUVEC pré-tratadas com SC (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apenas e FGF2 (50 ng/mL) favoreceram um aumento, após 24 h, no número de túbulos vasculares em Matrigel, em 64% e 53%, respectivamente, em comparação com células do controle não tratadas ($p < 0,05$). Quando adicionado ao FGF2, o SC (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibiu a diferenciação de HUVEC em comparação com o FGF2 apenas (Figura 3) ($p < 0,01$). O SG apenas e combinado com o FGF2 não produziu efeito significativo na formação de túbulos.

Figura 3

Angiogênese em embriões de *G. domesticus*

Neste estudo, o ensaio da CAM foi utilizado para determinar se os SG e SC possuem atividade pró-angiogênica na angiogênese embrionária. A vascularização foi avaliada em torno dos discos de metilcelulose na CAM do embrião de galinha (implantado no embrião com idade de 6 dias: E6).

A Figura 4 e 5 mostra os resultados da dimensão fractal de *box counting* (D_{BC}) nos grupos tratados com SC e SG, respectivamente, em embriões com 8 dias de desenvolvimento (E8; 192 horas de incubação do ovo).

Figura 4

Figura 5

De acordo com as Figuras 4 e 5, foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de vasos sanguíneos em relação ao grupo controle, apenas na maior concentração do SC e SG (2 mg/disco) testada, expresso nos valores da D_{BOX} 1.30

$\pm 0,03$ e $1,28 \pm 0,04$, respectivamente. Além disso, os SC e SG nesta mesma concentração (2 mg/disco) tiveram sua ação, no surgimento de vasos sanguíneos, semelhante ao efeito do conhecido fator angiogênico, FGF2 ($D_{\text{BOX}} = 1,34 \pm 0,03$). Entretanto, em concentrações do SC e SG abaixo de 2 mg/disco não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores das dimensões fractais em relação ao grupo controle.

Angiogênese em *M. musculus* adultos

Para investigar se o efeito pró-angiogênico do SC e SG, verificado em embriões, seria reproduzido a partir da vascularização de um animal adulto (angiogênese avançada), foi realizado o ensaio do implante subcutâneo de Gelfoam, em camundongos (Figura 6). Neste experimento, foi avaliada a formação de vasos sanguíneos, com base no teor de hemoglobina no interior da esponja de gelfoam implantado sob a pele dos animais, adjacente ao local da cirurgia, conforme o descrito anteriormente no tópico materiais e métodos.

Figura 6

Após 15 dias de experimento, o grupo controle contendo as esponjas de gelfoam tratados com PBS apresentaram claramente a presença de novos vasos sanguíneos, sendo a quantidade de hemoglobina (Hb) presente no plug equivalente a $0,20 \pm 0,07$ g/dL. No entanto, nos plugs de Gelfoam contendo FGF2 (controle positivo) foi verificado um maior conteúdo nos níveis de Hb ($0,53 \pm 0,1$ g/dL), significativo ($p < 0,01$) em comparação ao controle (Figura 6).

Ainda analisando a Figura 6, pode-se observar que, similarmente ao verificado no tratamento com o FGF2, no grupo tratado com o SC (2 mg/implante) ocorreu um

crescimento de vasos acentuado, determinado pelo teor de hemoglobina ($0,52 \pm 0,08$ g/dL), e significativamente ($p < 0,01$), maior ao observado em relação ao controle. É importante notar, no entanto, que no co-tratamento com SC (2 mg/implante) e FGF2 foi observado um conteúdo relativamente reduzido no teor de Hb ($0,11 \pm 0,04$ g/dL), indicando que o importante efeito pró-angiogênico exercido por essas duas substâncias isoladamente, foi novamente abolido quando ambas foram concomitantemente administradas. Outro fato observado foi que o SG apenas não aumentou o número de vasos sanguíneos, expresso no conteúdo de Hb, no entanto, a coadministração de SG com FGF2 reduziu para $0,20 \pm 0,11$ g/dL a quantidade de Hb ($p < 0,01$).

Discussão

O estímulo da angiogênese por fármacos pode ser usado para acelerar a cicatrização e o reparo tecidual, promovendo o crescimento de vasos sanguíneos nos tecidos isquêmicos (Heilmann *et al.*, 2002; Detillieux *et al.*, 2003). No presente estudo foi investigado o efeito pró-angiogênico do SC e SG em modelos *in vitro* e *in vivo*. De acordo com os nossos resultados, o SC induziu angiogênese tanto nos modelos *in vitro* como *in vivo*. No entanto, o SG promoveu angiogênese apenas no ensaio da CAM em embriões galinha. Os resultados do ensaio de viabilidade com o SC em HUVEC (Figura 1) sugerem que este apresenta apenas efeito citotóxico parcial (em torno de 50%) somente na maior concentração testada (3000 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o SG possui uma ação citotóxica parcial numa concentração mais baixa (1000 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando que o SC e SG apresentam baixo efeito tóxico para células humanas. Este resultado está de acordo com o trabalho de Hathcock e Shao (2007), os quais concluíram que SG e SC são seguros para o seu uso em longo

prazo, por possuírem baixo ou nenhum risco para a saúde relacionada aos seus efeitos adversos.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de proliferação e tubulogênese em HUVEC (Figura 2 e Figura 3), observou-se que na ausência do fator de crescimento (FGF2), o SC (3 µg/mL) significativamente estimulou a proliferação e diferenciação de HUVEC apresentando valores semelhantes ao FGF2, enquanto que o SG não apresentou efeito. Resultados semelhantes foram encontrados em alguns trabalhos, tal como, o aumento na proliferação de HUVEC induzida por exopolissacarídeos super-sulfatados (Matou *et al.*, 2005) e na diferenciação de células endoteliais da medula óssea estimulado por perlecana (Muthusamy *et al.* 2010). Outra observação foi que quando o SC 300 µg/mL foi combinado ao FGF2, verificou-se uma redução significativa na formação de microvasos (ensaio de tubulogênese) (Figura 3), porém o mesmo tratamento não exerceu efeito na proliferação de células endoteliais (Figura 2). Resultado inverso foi encontrado para o SG (300 µg/mL) + FGF2, sendo mostrada uma inibição na proliferação celular, comparado ao FGF2 apenas, mas nenhum efeito na formação de túbulos vasculares. Alguns efeitos similares nas diferentes etapas da angiogênese têm sido relatados com outros polissacarídeos. Por exemplo, na presença do FGF2, fucoidana (originado de alga) aumenta a formação de túbulos vasculares em Matrigel, porém não possui efeito na migração e proliferação de células endoteliais (Giroux *et al.*, 1998; Matou *et al.*, 2002). Também, tecogalana (de origem bacteriana) inibe a migração e formação de túbulos por células endoteliais na presença de VEGF, mas não possui efeito na proliferação (Sakamoto *et al.*, 1995). E de acordo com Matou *et al.* (2005), mostrando que um exopolissacarídeo (de origem bacteriana) na presença de FGF2 e VEGF promove angiogênese *in vitro* pelos seus

efeitos positivos na proliferação e formação de túbulos vasculares nas HUVEC, apesar de seu efeito inibitório na migração celular na presença de FGF2.

No ensaio da CAM, que é talvez o modelo mais conhecido para o estudo da angiogênese *in vivo* (Nguyen *et al.*, 1994; Yaconpoulus *et al.*, 2000), o SC e SG apenas na maior concentração testada (2 mg/disco) promoveram um aumento significativo no número de vasos (Figura 4 e 5). Esta importante ação pró-angiogênica do SC (2 mg/implante) foi porém confirmada no ensaio da angiogênese em adulto, realizada em camundongos, sendo observado que o SC sozinho promoveu a formação de neovasos, expresso na quantidade de Hb, no interior de esponjas de Gelfoam a partir de vasos pré-existentes (Figura 6). No entanto, o SG (2 mg/implante) sozinho, no camundongo, não chegou a produzir um aumento significativo na formação de vasos, em relação ao controle, o que evidencia a efetividade do SC em relação ao SG na especificidade dos efeitos obtidos em relação a diferentes modelos de estudo na vascularização. No mesmo implante, tanto o SC quanto o SG quando administrados em associação com o FGF2, foram capazes de anular o potente efeito angiogênico desse fator de crescimento, confirmando neste ensaio *in vivo* os resultados obtidos em nossos estudos *in vitro* (proliferação e tubulogênese). GAG e outros polissacarídeos sulfatados agem via FGF2 e VEGF (Yayon *et al.*, 1991; Rahmoune *et al.*, 1998; Matou *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2005). Nos últimos anos alguns estudos tem mostrado que o SC participa da sinalização do FGF2 (Bao *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007). Este polissacarídeo modula a ligação do FGF2 ao FGFR, de forma individual ou em sítios de ligação de baixa afinidade (Smith *et al.*, 2007). Foi verificado que as estruturas químicas do SC podem modular a ligação do FGF2 e a ativação do FGFR de uma forma específica em cada tipo de célula (Nikitovic *et al.*, 2008). Estudos anteriores revelaram que

ambos os efeitos estimuladores e inibidores de vários GAG sobre o crescimento de diferentes células, bem como na sinalização do FGF2, é dependente da sua estrutura química, sendo esta crucial para esses efeitos (Bao *et al*, 2004; Deepa *et al*, 2004; Delehedde *et al*, 1996; Ling *et al*, 2006; Smith *et al*, 2007). Dependendo da estrutura química presente na superfície da célula e/ou na matriz extracelular (Nugent e Iozzo, 2000), certos carboidratos sulfatados podem efetivamente sequestrar o FGF2, prevenindo assim a ativação dos receptores de FGF, levando a uma inibição prolongada da angiogênese (Dias *et al.*, 2005). No entanto, outras macromoléculas sulfatadas podem também ser capazes de se ligar aos fatores de crescimento de ligação à heparina (tais como FGF2 e VEGF) e, assim, aumentar as suas propriedades pró-angiogênicas. O alto peso molecular, relacionado ao teor de sulfato, por exemplo, é um fator chave na modulação de polissacarídeos na angiogênese (Matou *et al.*, 2005). O SC encontrados na cartilagem de animais é sulfatado nas posições -4-O e -6-O (Seno *et al*, 1975). De fato, carboidratos sulfatados ricos principalmente em regiões 4-O-sulfatados, tal como o SC, ligam-se ativamente ao FGF2 e modulam a sua sinalização (Taylor *et al.*, 2005), podendo ser sugerido que o SC exógeno se liga ao FGF2 estimulando a angiogênese. Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a coadministração de SC ou SG e FGF2, exógeno, não favoreceu um aumento no estímulo da atividade angiogênica fornecida por esse fator de crescimento sozinho, provocando uma desregulação da proliferação e diferenciação celular. É possível sugerir a ocorrência de um mecanismo competitivo (causado por antagonismo ou comportamento agonista parcial), relacionado aos compostos sulfatados (SC e SG) administrados juntamente com o FGF2, o que não mais possibilitou a ligação FGF2 - FGFR, bloqueando as funções relacionadas com as células endoteliais. Uma investigação

mais detalhada sobre os mecanismos que envolvem os efeitos do SC e SG no processo de angiogênese devem ser estudados. Dessa forma, devido aos riscos que envolvem a indução da angiogênese, o uso destas substâncias para alguns tratamentos clínicos, tais como aqueles requeridos na angiogênese terapêutica exige cautela.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que, o SC (principalmente) e SG exibem propriedades pro-angiogênicas *in vitro* (proliferação e tubulogênese em HUVEC), bem como *in vivo* (angiogênese embrionária e avançada). Estes efeitos podem ser atribuídos as suas estruturas químicas, que são semelhante aos relatados constituintes da MEC. A ação eficaz do SC na formação vasos sanguíneos, bem como sua baixa citotoxicidade sugere a sua utilização como uma estratégia alternativa em situações clínicas que exigem vascularização, como na reparação de tecidos, isquemia ou disfunções relacionadas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho do Dr. Marcelo Manaschin e da Dr^a. Maria Beatriz da Rocha Veleirinho (Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal / CCA - UFSC). Somos gratos a Giovanni Loss e Lisiê Silva por sua assistência técnica. Esta pesquisa foi financiada pelas agências brasileira de pesquisa CNPq, CAPES e FACEPE (bolsa de estudo).

Referências

- Ambler, C.A., Schmunk, G.M., Bautch, V.L. 2003. Stem cell-derived endothelial cells/progenitors migrate and pattern in the embryo using the VEGF signaling pathway. *Dev Biol.* 257, 205-219.
- Arciniegas, E., Parada, D., Graterol, A. 2003. Mechanically altered embryonic chicken endothelial cells change their phenotype to an epithelioid phenotype. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 270, (1):67-81.
- Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L.P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N. et al. 1995. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, 365–371.
- Aviezer, D., Iozzo, R. V., Noonan, D. M., & Yayon, A. 1997. Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol Cell Biol.* 17, 1938–1946.
- Bahramsoltani, M., De Spiegelaere, W., Janczyk, P., Hiebl, B., Cornillie, P., Plendl, J. 2010. Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay. *Clinical Hemorrhology and Microcirculation* 46, (2-3): 189-202.
- Bao, X., Nishimura, S., Mikami, T., Yamada, S., Itoh, N., & Sugakahara, K. 2004. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of l-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neurotogenic and growth factor binding activities. *J Biol Chem.* 279, 9765–9776.
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
- Bischoff, J. 1995. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 5 (2), 69-74.
- Burgermeister, J., Paper, D.H., Vogl, H., Linhardt, R.J., Franz, G. 2002. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Carbohydr Res.* 337, 1459–1466.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9, 653-660.
- Carmeliet, P., Collen, D. 1997. Genetic analysis of blood Vessel formation: Role of Endothelial versus Smooth muscle cells. *Trends Cardiovas Med.* 7, (8):271-281.
- Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minn, J.D., Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936–942.
- Crolle, G., D'Este, E. 1980. Glucosamine sulphate for the management of arthrosis. A controlled clinical investigation. *Curr Med Res Opin.* 7, 104–109.

Davis, G.E., Stratman, A.N., Sacharidou, A., Koh, W. 2011. Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *Int. Rev Cell Mol Biol.* 288,101-165.

Darland, D.C., D'Amore, P.A., 1999. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J. Clin. Invest.*103, (2):157–158.

Darland, D.C., D'Amore, P.A., 2001. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52,107-49.

Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., & Sugahara, K. 2004. Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J. Biol Chem.* 279, 37368–37376.

Delehedde, M., Deudon, E., Boilly, B., Hondermarck, H. 1996. Heparan sulphate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 229, 398–406.

Detillieux, K.A., Sheikh, F., Kardami, E., Cattini, P.A. 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res.* 57, 8–19.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Maraschin, M., Ferreira, G., Gagliardi, A.R.T., Ribeiro Do Valle, R.M. 2008. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc Res.* 75, 34-44.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Vendruscolo, L.F., Neiva, T.J., Gagliardi, A.R., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R.M. 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 436–446.

Drabkin, D.L., Austin, J.H. 1932. Spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719-722

Fannon, M., Forsten, K.E., Nugent, M.A. 2000. Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: a model for regulation of cellular response. *Biochem.* 39, 1434–45.

Fioravanti, A., Collodel, G., 2006. In vitro effects of chondroitin sulfate, *Adv. Pharmacol.* 53, 449–465.

Folkman, J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 6(4), 273-286.

Giroux, J.L., Matou, S., Bros, A., Tapon-Bretoniere, J., Letourneur, D., Fischer, A.M. 1998. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. *Eur. J. Cell. Biol.* 77, 352-9.

- Harmer, N.J. 2006. Insights into the role of heparin sulphate in fibroblast growth factor signaling. *Biochem Soc Trans.* 34, 442-445.
- Hathcock, J.N., Shao, A. 2007. Risk assessment for glucosamine and chondroitin sulfate. *Regul Toxicol Pharmacol.* 47, 78–83.
- Heilmann, C., Beyersdorf, F., Lutter, G. 2002. Collateral growth: cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg.* 10, 570–578.
- Iozzo, R.V., Sanderson, R.D. 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 15, (5):1013-31.
- Iivanainen, E., Kahari, V.M., Heino, J., Elenius, K. 2003. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc. Res. Tech.* 60, 13–22.
- Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 930-934.
- Lee, Y.S., Yang, H.O., Shin, K.H., Choi, H.S., Jung, S.H., Hoon, S., Kim, Y.M., Oh, D.K., Linhardt, R.J., Kim, Y.S. 2003. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur. J. Pharmacol.* 465, 191-198.
- Ling, L., Murali, S., Dombrowski, C., Haupt, L. M., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., et al. 2006. Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells. *J Cell Physiol.* 209, 811–825.
- Liu, L., Yu, Q., Lin, J., Lai, X., Cao, W., Du, K., Wang, Y., Wu, K., Hu, Y., Zhang, L., Xiao, H., Duan, Y., Huang, H. 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.* 20, (11):1961-71. Epub 2011. Mar 30.
- Marti, H.H., Risau, W. 1999. Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb. Haemost.* 82, 44–52.
- Matou, S., Helley, D., Chabut, D., Bros, A., Fischer, A.M. 2002. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* 106, 213-21.
- Matou, S., Colliec-jouaul, S., Galy-fauroux, I., Ratiskol, J., Siquin, C., Guezennec, J., Fischer, A.M., Helley, D. 2005. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochem Pharmacol.* 69, 751–759.
- Mitsunobu, R., Kano, Y.M., Caname, I., Shigeru, I., Tetsuro, W., Yasuyoshi, O., Kohei, M. and Keiji, M. 2005. VEGF-A and FGF2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR signaling. *J Cell Sci.* 118, 3759-376.

Molteni, M., Modrowski, D., Hott, M., & Marie, P. J. 1999. Alterations of matrix- and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. *Cell Tissue Res.* 295, 523–536.

Murakami, M. 2012. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int. J. of Vasc. Medicine.* 2012, 2012:293641.

Muthusamy, A., Cooper, C.R, Gomes-Jr, R.R. 2010. Soluble perlecan domain enhances vascular endothelial growth factor-165 activity and receptor phosphorylation in human bone marrow endothelial cells. *BMC Biochem.* 11, 43.

Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N. 2008. Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 72–83.

Nugent, M.A., Iozzo, R.V. 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32, 115–120.

Nguyen, M.; Shing, Y.; Folkman, J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res.* 47, 31–40.

Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., & Fernig, D. G. 1998. Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate. *J Biol Chem.* 273, 7303–7310.

Rapraeger, A. C., Krugka, A., & Olwin, B. B. 1991. Requirement of heparin sulphate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Sci.* 252, 1705–1708.

Rusnati, M., Presta, M. 1996. Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycan. Biological implications in neovascularization. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26, 15–23.

Saito, A., Munakata, H. 2004. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. *Electrophoresis* 25, 2452–2460.

Soker, S., Goldstaub, D., Svahn, C.M., Vlodaysky, I., Levi, B.Z., Neufeld, G. 1994. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1339–1347.

Stringer, S.E. 2006. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 34, (3):451-3.

Tardieu, M., Gamby, C., AVRAMOGLU, T., Jozefonvicz, J., Barritault, D. 1992. Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *J. Cell. Physiol.* 150, 194–203.

Taylor, K. R., Rudisill, J. A., & Gallo, R. 2005. Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem.* 280, 5300–5306.

Sakamoto, T., Ishibashi, T., Kimura, H., Yoshikawa, H., Spee, C., Harris, M.S., et al. 1995. Effect of tecogalan sodium on angiogenesis in vitro by choroidal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1076-83.

Seno, N.; Anno, K.; Yaegashi, Y., Okuyama, T. 1975. Microheterogeneity of Chondroitin Sulfates from Various Cartilages. *Connect Tissue Res.* 3(1), 87-96.

Smith, S. M. L., West, L. A., Govindraj, P., Zhang, X. D., Ornitz, M., Hassel, J. R. 2007. Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF2 to FGF receptors. *Matrix Biol.* 3, 175–184.

Yancopoulos, G.D.; Davis, S.; Gale, N.W.; Rudge, J.S.; Wiegand, S.J, Holash, J 2000. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242–248.

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., & Ornitz, D. M. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848.

Yip, G.W., Smollich, M., Götte, M. 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol. Cancer. Ther.* 5, 2139-2148.

Zammarettia, P., Zischa, A.H. 2005. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 493-503.

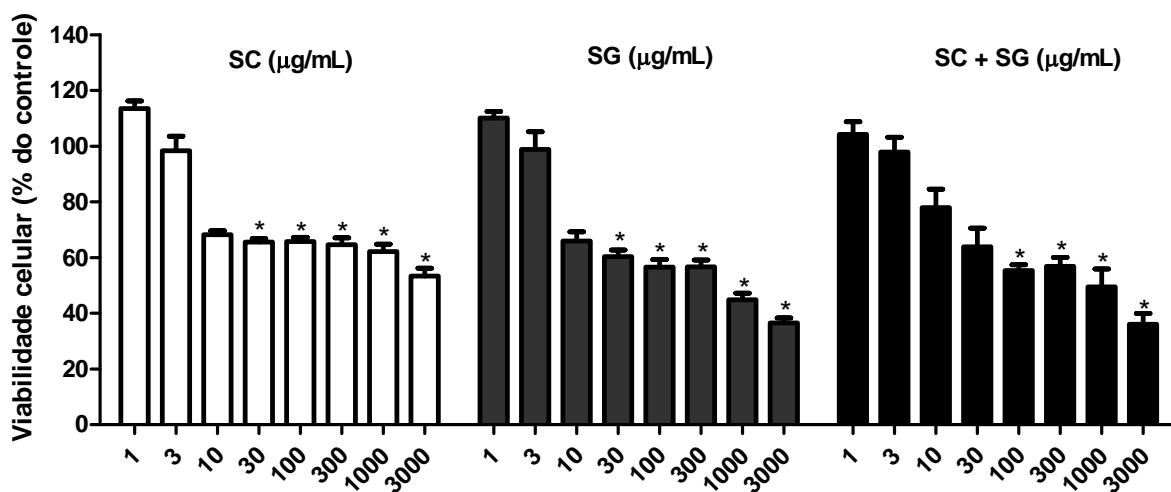
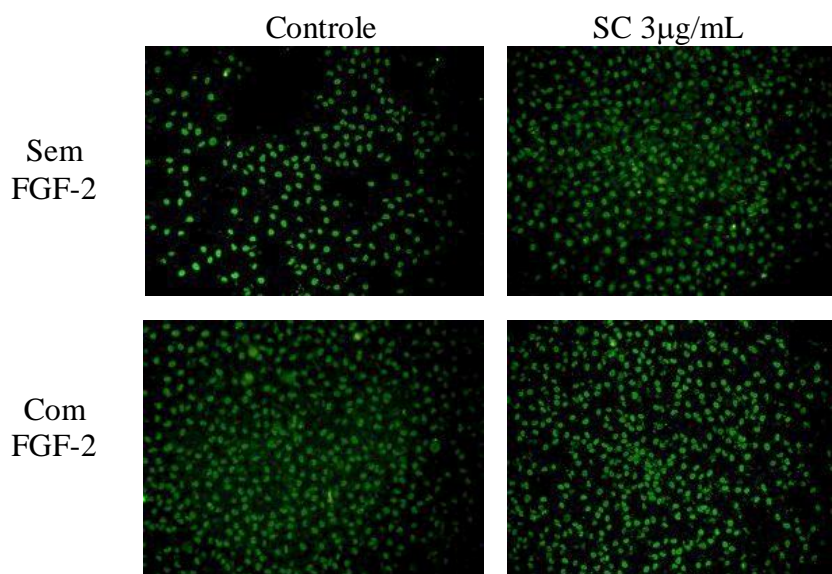
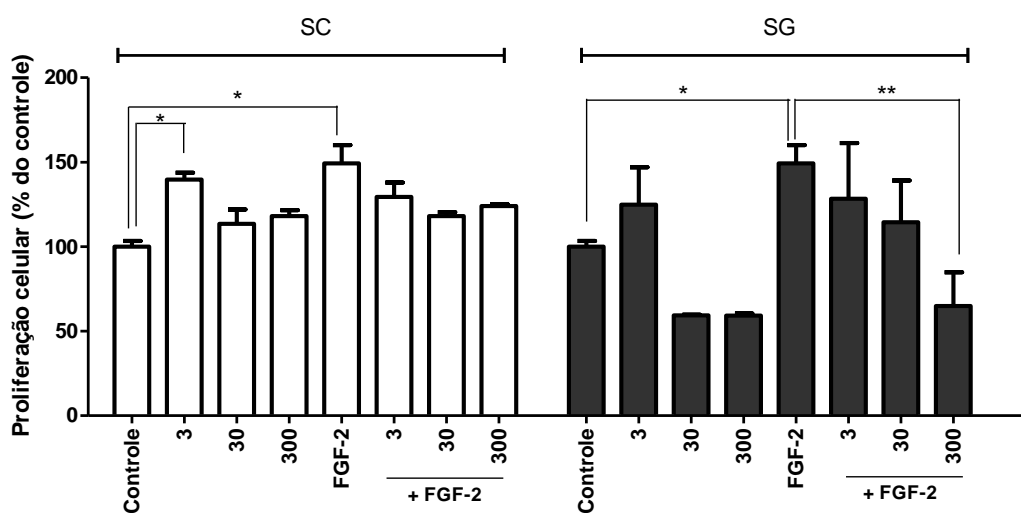


Figura 1. Efeito do SC, SG isoladamente (1-3000 µg/poço) e em associação na viabilidade de células da linhagem HUVEC (5.0×10^6 células/poço). Após 48 h de exposição às substâncias, foi determinada a percentagem de células viáveis através da incubação (4h) com MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como percentagem do controle (meio RPMI-1640). As colunas denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de $*p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguida do teste Tukey).



(A)



(B)

Figura 2. Efeito do SC e SG, na presença e ausência do FGF2 na proliferação de células HUVEC avaliadas pela técnica de BrdU. Os experimentos foram realizados como descrito no item Material e Métodos. (A) Fotografias mostram a marcação de HUVEC positivas para o BrdU tratadas sem FGF2 (topo superior) ou com 50 ng/ml de FGF2 (topo inferior) e na ausência (coluna da esquerda) ou na presença de 3 mg/ml de SC (coluna da direita). Aumento de 10X. (B) A quantificação de células BrdU-positivas na presença de SC e SG (3, 30, 300 µg/mL), sozinho ou combinado ao FGF2 (50 ng/mL) é mostrado no gráfico. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células do controle. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

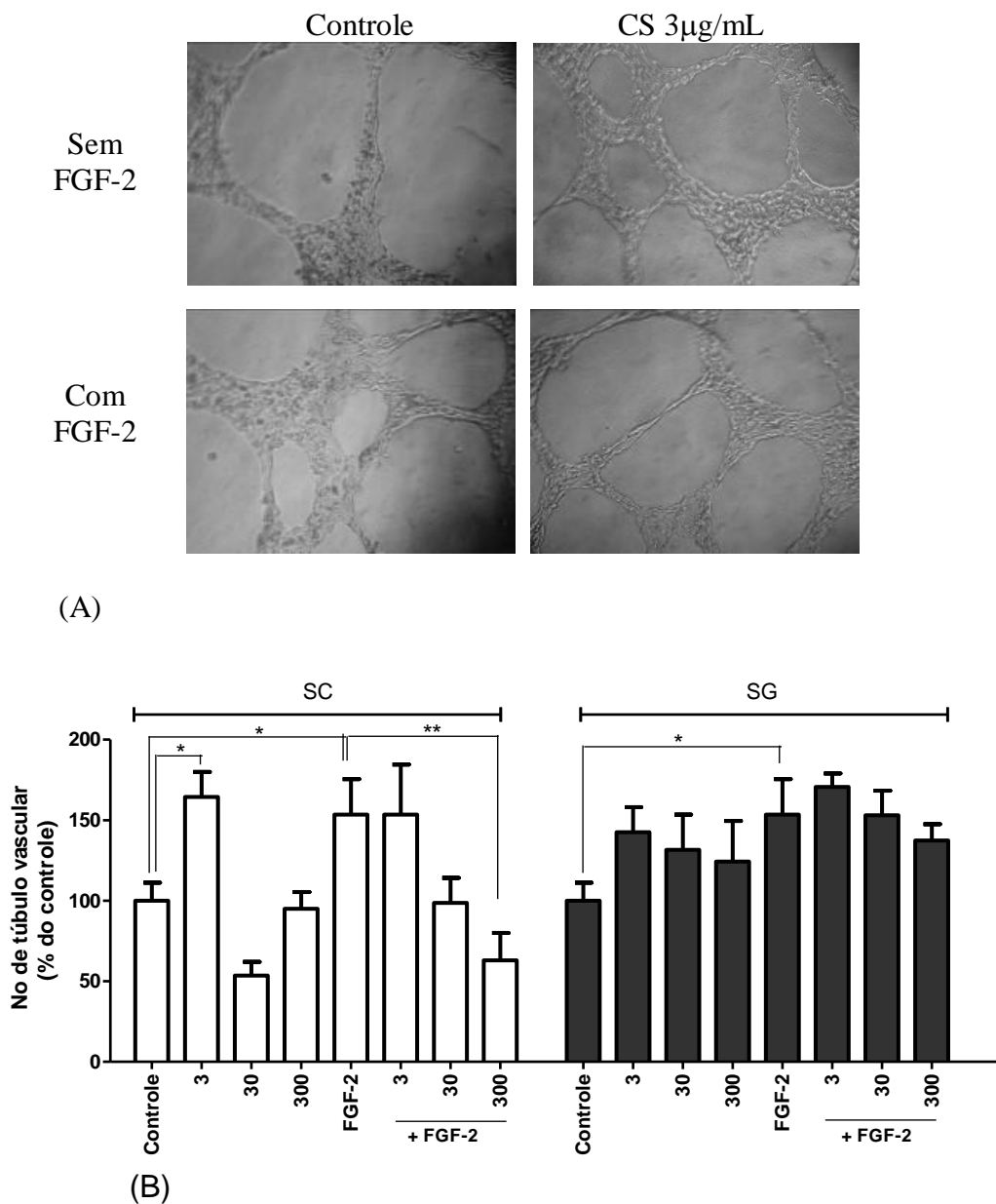


Figura 3. Efeito do SC e SG, na presença e ausência do FGF2 na formação de túbulos em Matrigel. Os experimentos foram realizados como descrito no item Material e Métodos. (A) Fotografias mostram a formação do túbulo vascular em HUVEC tratadas sem FGF2 (topo superior) ou com 50 ng/ml de FGF2 (topo inferior) e na ausência (coluna da esquerda) ou na presença de 3 mg/ml de SC (coluna da direita). Aumento de 10X. (B) A quantificação do SC e SG (3, 30, 300 µg/mL), sozinho ou combinado ao FGF2 (50 ng/mL) na formação de túbulos vasculares é mostrado no gráfico. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células do controle. Cada barra representa a média ± desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01.

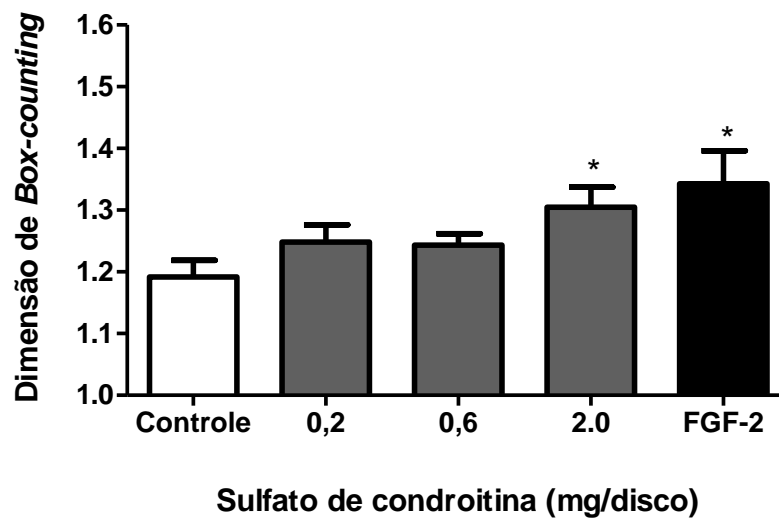


Figura 4. Efeito estimulatório do SC (0,2 - 2 mg/disk) na vascularização da CAM no 8º dia. O resultado foi quantificado, por imagens esqueletonizadas, por dimensão de *Box-counting* (D_{BC}). Os controles foram realizados com veículo (água, controle negativo) e FGF2 (50 ng/disco, controle positivo). Cada barra representa a média \pm SEM de seis ovos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs o controle negativo; # $p < 0.01$ vs FGF2 (ANOVA e Tukey como teste de *post hoc*)

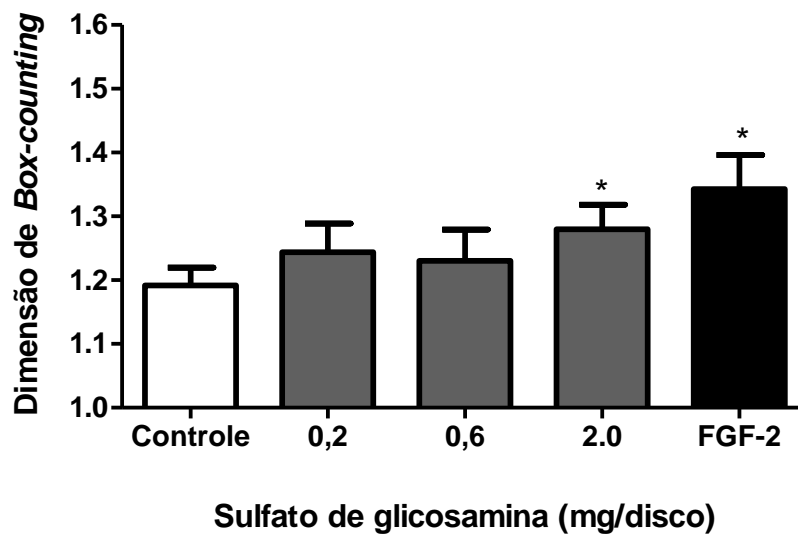


Figura 5. Efeito estimulatório do SG (0,2 - 2 mg/disk) na vascularização da CAM no 8º dia. O resultado foi quantificado, por imagens esqueletonizadas, por dimensão de *Box-counting* (D_{BC}). Os controles foram realizados com veículo (água, controle negativo) e FGF2 (50 ng/disco, controle positivo). Cada barra representa a média \pm SEM de seis ovos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs o controle negativo; # $p < 0.01$ vs FGF2 (ANOVA e Tukey como teste de *post hoc*)

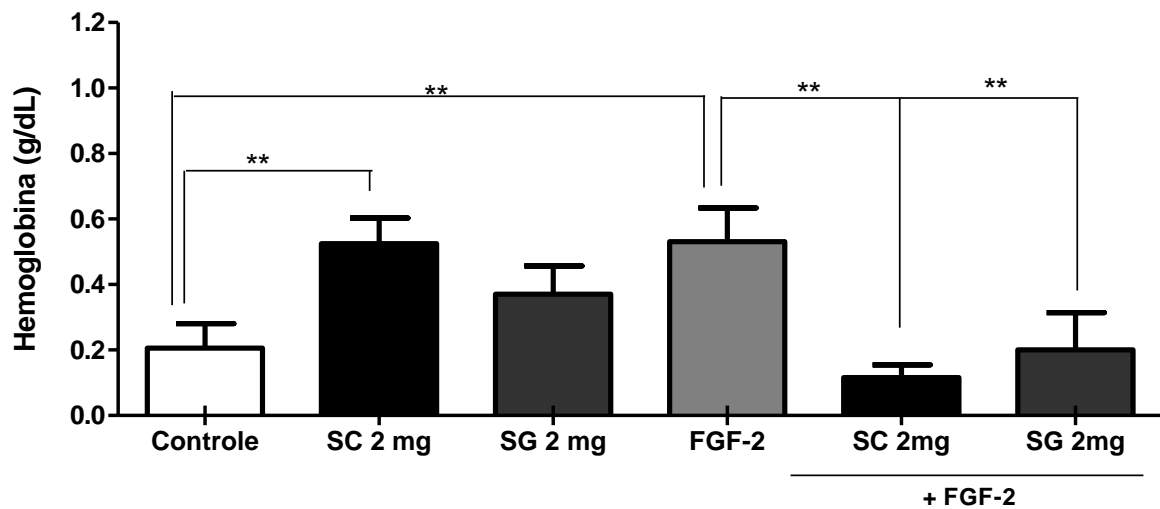


Figura 6. Efeito do SC ou SG (2 mg/animal) e combinado ao FGF2 (50 ng/animal) em plugs de gelfoam implantados (s.c.) em camundongos, espécie *M. musculus*, adultos, com base no conteúdo de hemoglobina existente no gelfoam (570 nm). Nos tratamentos os implantes foram adsorvidos de um volume de 50 uL de FGF2 (50 ng), em presença ou ausência do SC ou SG. Nos controles foram utilizados 50 uL de PBS (veículo) e FGF2 (50 ng) como controle negativo e positivo, respectivamente. Cada coluna e barra vertical representa a média E.P.M de pelo menos 5 animais e os asteriscos denotam diferenças, estatisticamente significativa ao nível de $**P < 0,01$.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

O SC e o SG produzem um efeito citotóxico relativamente baixo em células endoteliais humanas, como evidenciado pelo ensaio de viabilidade na linhagem celular HUVEC.

O SC (3 $\mu\text{g/ml}$), mas não o SG, estimula a proliferação e diferenciação de HUVEC, apresentando resultado similar ao promovido pela administração de FGF2 (50 ng/mL).

A dimensão fractal, metodologia utilizada para quantificar a formação de vasos sanguíneos nas membranas vitelínicas e corioalantóide em embriões de *G. domesticus*, demonstrou ser uma ferramenta eficaz na análise das imagens quanto ao efeito do SC e do SG na formação de vasos sanguíneos.

Ambos, SC e SG (2 mg/disco) estimularam o processo de angiogênese na membrana corioalantóica de embriões de galinha.

O SG (0,001-0,1 mg/disco) foi relativamente mais efetivo do que o SC (0,030-0,1 mg/disco) na formação de vasos sanguíneos na membrana vitelínica de embriões de *G. domesticus*, pois exerceu ação pró-vasculogênica e pró-angiogênica num maior intervalo de concentrações administradas.

A ação pró-angiogênica do SC (2 mg/disco) promovida durante o desenvolvimento embrionário de galinha foi reproduzida sobre a angiogênese avançada de camundongos (*Mus musculus*) adultos, no ensaio do Gelfoam. No entanto, neste ensaio, nenhum efeito foi apresentado pelo SG.

Em todos os ensaios *in vivo* realizados com embriões de *G. domesticus*, os valores das dimensões fractais referentes aos tratamentos com SC e SG foram semelhantes aos apresentados nos tratamentos com 50 ng de FGF2.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que o estímulo na formação de vasos sanguíneos pelo SC e SG pode ser utilizado no futuro em situações clínicas, na qual exista um suprimento e/ou crescimento ineficientes de vasos, tal como, na isquemia e na cicatrização.

ANEXOS



Submissions Being Processed for Author Fernanda Borba

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Angiogenic properties of glucosamine and chondroitin sulfates: An in vivo study by fractal analysis	Apr 14, 2012	Apr 14, 2012	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

**Anexo 1: Angiogenic properties of glucosamine and chondroitin sulfates:
An *in vivo* study by fractal analysis**

Fernanda Katharine de Souza Lins Borba^{1,2}, Giovanni Loos Queiroz Felix², Lisiê Silva, Paulo Fernando Dias², Romildo Albuquerque Nogueira^{1*}

¹Laboratory of Theoretical-Experimental Biophysics and Computing, Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900, Recife, Brazil.

²Laboratório of Studies in Bioactivity and Animal Morphogenesis, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88049-900, Florianópolis, Brazil

*Corresponding Author: R. A. Nogueira: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, Email: ran.pe@terra.com

Abstract

The chorioallantoic membrane (CAM) of the avian chick is an often used *in vivo* model to investigate angiogenesis. Based on the CAM, we have carried out to a chick yolk sac membrane (YSM) model, which provides a simple and easy method *in vivo* for screening of vasculo-angiogenesis-affecting agents. An image processing model was developed to detect the vessels and especially the capillaries of the YSM after exposure to glucosamine sulfate (GS; 0.001-0.1 mg/implant) and chondroitin sulfate (CS; 0.001-0.1 mg/implant). The result was binary image of microvascular networks. Fractal box-counting (D_{BC}) and information (D_{INF}) dimensions were used to quantify vasculo-angiogenic activities of GS and CS. GS (0.001-0.1 mg) implants on the 2-day YSM displayed an increase in the fractal dimensions relative to the control group on vitelline vessel growth. However, for CS, only concentrations of 0.03-0.1 mg/implant were effective. Moreover, the highest tested concentrations (0.1 mg/implant) of both CS and GS displayed D_{BC} and D_{INF} values similar to those of the proangiogenic substance fibroblast growth factor-2. We suggest that CS and GS act as modulators, stimulating vasculogenesis and angiogenesis processes in the chick embryo YSM. Furthermore, both methods, D_{BC} and D_{INF} , could be of particular importance for studies focused on the characterization of response to new agents, needing an extensive sampling to get an accurate and objective quantification of the vessel formation.

Keywords: chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, angiogenesis, vasculogenesis, fractal dimension, chick yolk sac membrane.

1. Introduction

During embryogenesis, the early vasculature is established by vasculogenesis, which is a process defined as the formation of primordial blood vessels from in situ differentiation of mesodermal progenitor endothelial cells (angioblasts) to endothelial cells (Hanahan and Folkman, 1996; Cameliét, 2003; Pandya et al., 2006). Afterwards, these cell clusters lay down a primary vascular plexus (Ruiter et al., 1992; Asahara and Isner, 2002). The formation of new blood vessels from preexisting ones is denominated angiogenesis, and is associated with a variety of normal and pathophysiological processes (Folkman, 1995; Pandya et al., 2006; Poveshchenko and Konenkov, 2010). However, it has become evident that progenitors to vascular endothelial cells also exist in adults, and they can promote vessel formation (adult vasculogenesis) associated with some pathologies such as cancer and ischemia (Zammaretti and Zisch, 2005; Young et al., 2007; Tongers et al., 2010).

Vasculogenesis and angiogenesis are stimulated by a large number of growth factors, notably including fibroblast growth factor-2 (FGF2) and vascular endothelial growth factors (VEGF) (Cameliét, 2003; Pandya et al., 2006). FGF2 is mainly released by damaged cells at wound edges (Arciniegas et al., 2003). VEGF production is up regulated in hypoxic conditions such as those found in ischemic tissues (Liu et al., 2011). FGF2 as well VEGF-A are members of large families of proteins which bind to the respective cell surface tyrosine kinase receptors. Indeed, extracellular FGF2 binds heparin and heparan sulfate proteoglycans (HSPG) within the extracellular matrix (ECM) and modulates the function of a wide range of cell types (Guimond et al., 1993; Nugent and Iozzo, 2000; Qiao et al., 2003)

As extracellular matrix molecules, proteoglycans are also major molecules involved in angiogenesis stimulus, mostly ascribed to highly sulfated heparan chains which form high affinity complexes with FGF2 and its receptors (FGF-R) and thus promote increased angiogenic responses. Besides heparin and highly sulfated heparin sulfate, few other sulfated polysaccharides can influence vascular endothelial cell growth (Stringer, 2006; Iozzo and Sanderson, 2011). We hypothesized that chondroitin sulfate (CS) and glucosamine sulfate (GS), compounds with similar composition to sulfate heparin (Yip et al., 2006), would be effective modulators of angiogenesis. CS and GS are obtained from mammal cartilage. They have been widely applied in cardiovascular diseases and osteoarthritis treatment (Ma et al., 2002; Saito & Munakata, 2004). Determining the efficacy of agents to regulate angiogenesis requires the use of angiogenesis assays. In quantitative and qualitative studies of angiogenesis *in vivo*, many test models have been adopted (Gimbrone, 1974; Gabison *et al.*, 2004; Tufan and Satiroglu-Tufan, 2005), among which the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model (Jakob et al., 1978; McCormick et al., 1984; Vu et al., 1985; Peek et al., 1988; Nguyen et al., 1994) is perhaps the most widely employed *in vivo* model for studying vessel development (Ribatti et al., 2001; Li et al., 2010). Based on the CAM assay, we used the chick embryo yolk sac membrane (YSM) model to test the efficiency of CS and GS in vasculo-angiogenesis modulation. This method includes some advantages compared with the CAM assay, for example the immaturity of the embryo nervous system, shorter duration of incubation time and the possibility to evaluate the early blood vessel formation - vasculogenesis (Chapman et al., 2001; Wang et al., 2007; Dias et al., 2008a, 2008b). However, quantification of this assay has been troublesome and often done using subjective scoring methods, leading to difficulties in the comparison of results.

(Sologub et al., 1992; Hisa et al., 1998; Tamilarasan et al., 2006). Accurate measures are required if meaningful and statistically robust data need to be obtained from the CAM, YSM and other angiogenesis assays. A vascular network can be considered a well-established fractal object due to its self-similarity, irregularity, fractional dimension and dependence on the scale of blood vessel dimensions. Then, we are proposing the use of fractal geometry to provide an objective measurement of vasculo-angiogenic activity of glucosamine and chondroitin sulfates on the microvascular network of the yolk sac membrane of chick embryos.

In this study, we examined the potential use of fractal geometry to provide an objective measurement of vasculo-angiogenic activity of glucosamine and chondroitin sulfates on the microvascular network of the yolk sac membrane of chick embryos.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

The SC and SG used in these experiments were kindly provided by the Phytomare[®] Company (Governador Celso Ramos, SC, Brazil) with purity exceeding 90%.

2.2 Animals

Pathogen-free fertilized chicken eggs (Ross strain, n = 6) were supplied by poultry producers (Tyson S.A., SC, Brazil).

All animal studies were carried out in accordance with the procedures outlined in protocol number PP00586/2011/CEUA/UFSC, approved by the Local Committee for

the Care and Ethical Use of Animals in Research (CEUA/UFSC, Florianopolis, SC, Brazil).

2.3 Chicken yolk sac membrane assay

The ability of SC and SG to stimulate vasculogenesis and angiogenesis was determined by the yolk sac membrane assay (YSM), according to the method described by Dias et al. (2008). Pathogen-free fertilized chicken eggs (Ross strain) were furnished by a local commercial incubatory and initially incubated at 37.5 °C and 70% air moisture. After 48 h the eggs were removed from the incubator, and a window (10mm diameter) was opened in the egg shell, at a position adjacent to the embryo. The treatment *in ovo* was performed by implanting disk-shaped methylcellulose supports (7.5 µl volume, 3-mm diameter; one disk per embryo) absorbed with CS, GS and FGF2 (positive control) on the 2-day old yolk sac membrane (YSM), near the embryo, where blood islands were still present in the early establishing capillary network (YSM assay), as evidence of vasculo-angiogenesis. After these manipulations the windows were closed with black binding cellophane tape and the eggs were returned to the incubator until the 4th day (96 h, or E4 embryonic day). The concentrations of CS and GS administered to vascular membranes by means of the methylcellulose disk supports ranged from 0,001 to 0,1 mg/disk. Disks containing fibroblast growth factor-2 (FGF2; 50 ng/disk) and blank methylcellulose disks (ultrafiltered water as solvent; pH 7.2) were used as positive and negative controls, respectively. For each egg, images were captured with a Motic 1000 1.3 MP camera coupled to a stereomicroscope (20x). The vessels in the region around the limit of MC disk were quantified through the calculation of the fractal dimension.

2.4 Image segmentation

The digital images were processed to calculate the fractal dimension of the vascular network as follow. First, the images were segmented manually using Microsoft® Paint to separate the blood vessels from the rest of the images. Each vessel was traced by a line with thickness of one pixel, after which the images were binarized (background in black and vase in white), also using Microsoft® Paint. Finally, the software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System was used to calculate the fractal dimensions of blood vessels.

2.5 Fractal analysis

The methods used to calculate the fractal dimension were Box Counting Dimension (D_{BC}) and Information Dimension (D_{INF}). The calculation of D_{BC} and D_{INF} were carried out by Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System. The D_{BC} is obtained by covering up the fractal object with $N(r)$ boxes containing at least one point of the fractal object. This procedure is repeated with boxes of different sizes and draws up a double log graph of $N(r)$ in function on the sides of boxes r (Kunick et al., 2009). The slope of this graph with inverted signal is the box-counting dimension, which can bedefined formally by the following expression:

$$D_{BC} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \epsilon) - \log N(r)}{\log(r + \epsilon) - \log(r)} \right]$$

The D_{INF} is a method capable of characterizing a fractal structure that is not homogeneous in its invariance of scale. The object is also covered by boxes, but it takes into account the relative probability of occupancy of the elementary boxes used

to cover the fractal object. In the other words, the size will depend on the frequency each box is visited. This method can be defined by the following expression:

$$D_{INF} = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{(S(r + \varepsilon) - S(r))}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right]$$

Where $S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$ is called the Kolmogorov entropy. N is the number of boxes, $m_i = M_i/M$, and M_i is the number of points in the n^{th} box and M is the total number of points on the fractal object (KUNICKI et al., 2009).

2.6 Data analyses and statistics

Data are represented as means \pm S.E.M. obtained from at least two independent experiments. The statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey (HSD) method. Effects were considered to be statistically significant at P values less than 0.05 (*).

3. Results

In this study, the YSM assay was used to determine whether glucosamine and chondroitin sulfates displayed early stimulation of vasculo- and angiogenesis. We evaluated the vascularization around the methylcellulose disk in chick embryo YSM (implanted after 2 days of preliminary egg incubation: E2).

Figure 1 show the vascular network-skeletonized images of yolk sac membranes of chick embryos, for the groups treated with CS and/or FGF2 and the control group and Figure 2 show the box counting (D_{BC}) and information (D_{INF}) fractal dimensions these groups.

A visual inspection of the skeletonized images (figure 1) discloses an increase of blood vessels number only at the highest concentration of CS (0.1 mg/mL) and in the group treated with FGF2 as compared to the control group. The fractal dimensions confirm these findings. In Figure 2 can be noted that for CS, only the effects on blood vessel at the concentration of 0.1 mg/disk resulted in D_{BC} and D_{INF} values significantly different from the control group with $p < 0.01$ for blood vessel formation. However, 0.03 mg/disk CS produced a significant increase only as measured by D_{BC} with $p < 0.05$. It is important to note that the pro-angiogenic effect of FGF2 ($D_{BC} = 1.32 \pm 0.06$, $D_{INF} = 1.40 \pm 0.06$) was similar to the highest concentration of CS administered (0.1mg/disk, $D_{BC} = 1.23 \pm 0.04$, $D_{INF} = 1.34 \pm 0.04$).

Figure 1

Figure 2

The skeletonized images and the fractal dimension values of GS (0.001-0.1 mg/disk), FGF2 (50 ng/disk) and control (vehicle) groups in YSM are shown in figures 3 and 4, respectively.

A Visual analysis of the skeletonized images in figure 3 indicates that GS, for all concentrations tested, have promoted an increase in the amount of vitelline vessels as compared to control group (vehicle). Figure 4 shows a highly significant ($p < 0.01$) increase in amount of vitelline vessels, expressed in the values of D_{BC} , which ranged from 1.18 ± 0.06 (0.001 mg GS / disk) to 1.28 ± 0.08 (0.1 mg GS / disk) and D_{INF} which ranged from 1.27 ± 0.06 (0.001 mg GS / disk) to 1.39 ± 0.09 (0.1 mg GS / disk), as compared to the control ($D_{BC} = 1.026 \pm 0.01$ e $D_{INF} = 1.13 \pm 0.01$).

Moreover, the pro-angiogenic effects of FGF2 were similar to those of GS at the highest concentration administered (0.1 mg/disk; $D_{BC} = 1.28 \pm 0.08$, $D_{INF} = 1.39 \pm 0.08$).

It is noteworthy that the effects promoted by GS in the vitelline vessels were qualitatively similar to those afforded by CS. Despite these results, it should be noted that the pro-vasculo/angiogenic activity of GS was far more potent than that displayed by CS (CS treatment at the concentration of 0.03 mg/implant; Fig. 1.A). The findings in Fig. 2 demonstrate that after a 2-day treatment, GS at concentrations highest than 0.001 mg/implant significantly increased the vascular network in relation to the control. A dose 0.001 mg GS / implant was around 5 % more potent than same dose at CS.

The results suggest that the vasculogenesis and angiogenesis processes in YSM chick embryos might be remarkably increased by CS and GS, indeed displaying results similar to those found at pro-angiogenic agent as FGF2.

The results also show that the box-counting and information fractal dimensions were adequate parameters for distinguishing the vascular network resulting of treated (CS or GS) and control groups.

Figure 3

Figure 4

4. Discussion

Dysregulated angiogenesis has been implicated in tumor growth and angioproliferative diseases (Folkman, 1995; Pandya et al., 2006). However

pharmacological stimulation of angiogenesis could be beneficial in clinical situations where active angiogenesis is therapeutically required, such as wound repair and ischemia (Detillieux et al., 2003; Sarlon et al., 2011). In this regard, the current study demonstrates that both glucosamine and chondroitin sulfates substantially promoted the vasculogenesis as well as developmental angiogenesis (instead of decreasing this process) in the yolk sac membrane (YSM) of chick embryos cultured *in vivo*. In contrast to the “classic” CAM assay, the yolk sac membrane (YSM) assay (Chapman et al., 2001; Wang et al., 2007) used in the current work may distinguish between newly formed microvessels (after application of drug-containing disks to the YSM) and those early vitelline vessels already present on the 2nd embryonic day of chick development (Dias et al., 2008a, 2008b).

Our findings are in accordance with the results obtained by Shepro (2006), who reported that CS induces pro-angiogenic effects by binding to fibrinogen/fibrin, mediating an improvement on endothelial cell migration and invasion in the fibrin matrix during cicatrization. Moreover, Tapon-Bretonnière et al. (2000) had also demonstrated that a CS obtained from sea cucumber, with the same structure that a mammalian chondroitin sulfate, increased endothelial proliferation and migration cell in the presence of heparin-binding growth. On the other hand, our results contrast by LIU et al (2005) demonstrated that CS may alternatively exert antiangiogenic effects via inhibition of transendothelial monocyte migration. And with the work by Nagaoka et al. (2010) when in his studies on the action of glucosamine in HUVECs showed that it inhibits the activation of endothelial cells *in vitro*, suppressing the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) that may result in a negative effect on adhesion and migration of these cells. Previous studies have revealed both stimulatory and inhibitory effects of various sulfated carbohydrates on different cells

growth and FGF2 signaling and it has been suggested that the fine structure may be the reason (Mundhenke et al., 2002; Deepa et al., 2004; Smith et al., 2007). A number of evidences have been reported concerning endogenous sulfated carbohydrates essential for the transport of FGF and activation of its receptors, due to the stabilization of a ternary complex arranged between FGF2 and its receptor with distinct chains of specific cell surface heparan sulfate species (Katz and Yamada, 1997; Gallagher, 1994; Miao et al., 1997; Nugent and Iozzo, 2000).

However, the ability of a particular carbohydrates to display pro- or anti-vascular properties appears to depend significantly on the degree of sulfation. The angiogenic activity of native fucoidans, which are sulfated to some degree (Matou et al., 2002), can be reversed into a clear-cut anti-angiogenic profile of action if they are oversulfated (Soeda et al., 2000; Dias et al., 2008a).

Several quantitative and semi-quantitative methods have been described to evaluate the response achieved by stimulators or inhibitors of angiogenesis (Guidolin et al., 2004). The fractal analysis has been shown as an adequate technique to detect changes in various biological systems (Shulze et al., 2008). Several studies have used fractal geometry as an appropriate tool able to describe the formation of the blood vasculature in various animal models, such as those focusing the development of vascular network in the CAM of chicken embryos (Kirchner et al., 1994; Arlt et al., 2003), CAM of quail embryos (Parsons-Wingarter et al., 1998), Zebrafish embryos (Chan and Cheng, 2003), Human cerebral cortex (Cassot et al., 2006), and Human retina (Kunick et al., 2009).

We described an image analysis method to evaluate the pro-angiogenic activity of CS and GS by using the *in vivo* YSM assay and by evaluating the fractal dimension of the capillary-like vessel network. The assessments using fractal geometry showed

that the substances under study promoted the development of primordial vessel networks. The stimulation afforded by the highest concentration of CS and GS (0.1 mg/disk) that was quantified by D_{BC} e D_{INF} , was very similar to the well-know pro-vascular effect of exogenous FGF2 (50 ng/disk) which induces pluripotent cells from the blastodisk of the chick embryos to differentiate *in situ*, or by recruitment from other regions on blastoderm, undergo vasculogenesis (Ruiter et al., 1992).

Our results indicate that the fractal dimension appears as a sensitive numerical index to characterize the development of capillary networks during vasculogenesis and angiogenesis processes in YSM assay and its evolution or modification. Df values obtained by the two methods studied here suggest that the two approaches describe similar aspects of the increase (or decrease) in complexity of the vascular network, but provide additional information. For instance, Df obtained by the box-counting method has a low-pass filter character. In other words, when the size of boxes increases, the higher irregular parts of an image are progressively removed while leaving the lower spatial parts. Thus, the calculated Df is an average property of the whole image (Chan and Cheng, 2003). The high Df values of the CS and GS treatment groups demonstrated that the complexity of vasculature as a whole has been improved. Due the box counting dimension does not take into account the amount of pixels per box, this study also considered the information dimension, which factors in the “weight” (amount of pixels) of each box. (Mendonça et al., 2007). Thus, the higher values obtained for the groups treated with CS and GS indicate that the “weight” (amount of blood vessels) has increased.

In conclusion, the values of D_{BC} and D_{INF} demonstrated that CS and GS act as modulators, stimulating the vasculogenesis and angiogenesis processes in YSM of chick embryos. The YSM assay as combined to fractal analysis have been of

particular importance for studies focusing on the characterization of responses to new agents for the control of diseases associated with angiogenic dysfunction. They require not only an adequate sampling but also an accurate and objective quantification of the effects to which the analysis of fractal dimension by means of the D_{BC} and D_{INF} might be instrumental in providing. Nonetheless, the mechanisms underlying the provasculogenic and angiogenic actions, remain to be characterized.

Acknowledgments

We wish to thank the Brazilian support agencies CAPES, FACEPE and CNPq for financial support (Fellowships).

5. References

- Arciniegas, E., Parada, D., Graterol, A., 2003. Mechanically altered embryonic chicken endothelial cells change their phenotype to an epithelioid phenotype. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.*270, (1):67-81
- Arlt, C., Schmid-Schönbein, H., Baumann, M., 2003. Measuring The Fractal Dimension Of The Microvascular Network Of The Chorioallantoic Membrane. *Fractals.*11, (2):205-212.
- Asahara, T., Isner, J.M., 2002. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.*11:171–178.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.*9:653–660.
- Cassot, F., Lauwers, F., Fouard, C., Prohaska, S., Lauwers-Cances, V., 2006. A novel three-dimensional computer-assisted method for a quantitative study of microvascular networks of the human cerebral cortex. *Microcirc.*13:1–18.
- Chan, P.K, Cheng, S.H, 2003. Fractal analysis of vascular complexity in cadmium-treated zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.*63:83-87.
- Chapman, S.C., Collignon, J., Schoenwolf, G.C., Lumsden, A., 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* 220:284–289.

Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., & Sugahara, K., 2004. Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.*279:37368–37376.

Detillieux, K.A., Sheikh, F., Kardami, E., Cattini, P.A., 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res.*57:8–19

Dias, P.F., Berti, F.V., Siqueira, J.M., Maraschin, M., A.G., Gagliardi A.R., Riveiro-do-Valle, R.M, 2008b. Trans-Resveratrol Inhibits Early Blood Vessel Formation (Vasculogenesis) Without Impairment of Embryonic Growth. *J Pharmacol Sci.*107:118–127.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Maraschin, M., Ferreira, A.G., Gagliardi, A.R., Riveiro-do-Valle, R.M., 2008a. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc Res.*75:34–44.

Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.*1:27–31.

Gabison, E., Chang, J.H., Javier, J., Lu Paul, C.S., Ye, H.Q., Kure, T., Kato, T., Azar, D.T., 2004. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res.*78:579-589.

Gallagher, J.T., 1994. Heparan sulphates as membrane receptors for the fibroblast growth factor. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*32:239–247.

Gimbrone, M.A.,1974. Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst.*52:413-427.

Guidolin, D., Vacca, A., Gastone, G., 2004. Nussdorfer, a and Domenico Ribattic, A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay in vitro. *Microvasc Res.*67:117–124.

Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B.B, Lindahl, U., Rapraeger, A.C., 1993. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF2, and FGF-4. *J Biol Chem.*268:23906-23914.

Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.*86:353–364.

Hisa, T., Kimura, Y., Takada, K., Suzuki, F., Takigawa, M., 1998. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro. *Anticancer Res.*18, (2A):783-790.

Iozzo, R.V., Sanderson, R.D., 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.*15, (5):1013-1031.

Jakob, W., Jentsch, K.D., Mauersberger, B., Heder, G., 1978. The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. *Exp Pathol.*15:241–249.

Katz, B.Z., Yamada, K.M., 1997. Integrins in morphogenesis and signaling. *Biochimie.*79:467–476.

Kirchner, L.M., Schmidt, S.P., Gruber, B.S, 1996. Quantitation of Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane Model Using Fractal Analysis. *Microvasc Res.*51:2–14.

Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.*42:930-934.

Li, Y.J., Duan, C.L., Liu, J.X., Xu, Y.G., 2010. Pro-angiogenic actions of Salvianolic acids on in vitro cultured endothelial progenitor cells and chick embryo chorioallantoic membrane model. *J Ethnopharmacol.*131, (3):562-566.

Liu, L., Yu, Q., Lin, J., Lai, X., Cao, W., Du, K., Wang, Y., Wu, K., Hu, Y., Zhang, L., Xiao, H., Duan, Y., Huang, H., 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.*20, (11):1961-1971.

Liu, Y., Yang, H., Otaka, K., Takatsuki, H., Sakanishi, A., 2005. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chondroitin sulfate A on human monocytic THP-1 cell migration. *Colloid Surf B.*43:216–220.

Ma, L., Rudert, W., Harnaha, J., Wright, M., Machen, J., Lakomy, R., Qian, S., Lu, L., Robbins, P.D., Trucco, M., Giannoukakis, N., 2001. Immunosuppressive effects of glucosamine. *J. Biol. Chem.*277:39343-39349.

Miao, H., Ornitz, D.M., Aingorn, E., Ben-Sasson, S.A., Vlodavsky, I., 1997. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, dimerization, signaling, and angiogenic activity by a synthetic heparin-mimicking polyanionic compound. *J. Clin. Invest.*99:1565–1575.

Matou, S., Helly, D., Chabut, D., Bros, A., Fischer, A.-M., 2002. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.*106:213–221.

McCormick, J.F., Nassauer, J., Bielunas, J., Leighton, J., 1984. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. *Scan. Electron. Microsc.*4:2023–2030.

Mendonça, M.B.M., Garcia, C.A.A., Nogueira, R.A., Gomes, M.A.F., Valença, M.M., Oréface, F., 2007. Fractal analysis of retinal vascular tree: segmentation and estimation methods. *Arq Bras Oftalmol.*70, (3):413-422.

Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., Friedl, A., 2002. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am. J. Pathol.*160:185–194.

Nagaoka, I., Igarashi, M., Hua, J., Ju, Y., Yomogida, S., Sakamoto, K., 2011. Recent aspects of the anti-inflammatory actions of glucosamine. *Carbohydr Polym.*84:825-830.

Nguyen, M., Shing, Y., Folkman, J., 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis. In the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res.*47:31–40.

Nugent, M.A., Iozzo, R.V., 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.*32:115–120.

Pandya, N.M., Dhalla, N.S., Santani, D.D., 2006. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol.*44, (5):265-274.

Parsons-Wingerter, P., Lwai, B., Yang, M.C., Elliott, K.E., Milaninia, A., Redlitz, A., Clark, J.I., Helene Sage, E., 1998. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bfgf and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc. Res.*55:201–214.

Peek, M.J., Norman, C., Markhan, R., Frases, I.S., 1988. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. *Exp. Pathol.*34, (1):35–40.

Poveshchenko, A.F., Kononkov, V.I., 2010. Mechanisms and factors of angiogenesis. *Usp Fiziol Nauk.*41, (2):68-89.

Qiao, D., Meyer, K., Mundhenke, C., Drew, S. A., Friedl, A., 2003. Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Brain Endothelial Cells. *J Biol Chem.*278:16045–16053.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P.H., Djonov, V., 2001. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec.*264:317-324.

Ruiter, M.C., Poelmann, E.D., Mentink, M.M.T., Vaniperen, L., Gittenberger-de-Groot, A.C., 1992. The early formation of the vascular system in quail embryos. In: Ruiter MC, editor. *Development of the vascular system in the embryo. A concept of the origin of systemic-pulmonary collateral arteries.* The Netherlands: Leiden Univ Bibl. p. 99–186.

Saito, A., Munakata, H., 2004. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. *Electrophoresis.*25:2452–2460.

Sarlou, G., Zemani, F., David, L., Duong Van Huyen, J.P., Dizier, B., Grelac, F., Collic-Jouault, S., Galy-Fauroux, I., Bruneval, P., Fischer, A.M., Emmerich, J.,

Boisson-Vidal, C., 2011. Therapeutic Effect of Fucoidan-Stimulated Endothelial Colony-Forming Cells in Peripherallschemia. *J Thromb Haemost.* Accepted manuscript online: 8 NOV 2011 10:02AM EST

Schulze, M.M., Hutchings, N., Simpson, T.L., 2008. The use fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. *IOVS* 49:1398-1406.

Shepro, D., 2006. *Microvasc Research*. Editora Elsevier, 1187 p.

Smith, S. M. L., West, L. A., Govindraj, P., Zhang, X. D., Ornitz, M., Hassel, J. R., 2007. Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF2 to FGF receptors. *Matrix Biol.*3:175–184.

Soeda, S., Kosako, T., Iwata, K., Shimeno, H., 2000. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.*1497:127–134.

Sologub, A.A., Akberova, S.I., Ziangirova, G.G., 1992. Emoxipin as an inhibitor of angiogenesis. *Biull Eksp Biol Med.*114, (12):620-622.

Stringer, S.E., 2006. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem Soc Trans.*34:451-453.

Tamilarasan, K.P., Kolluru, G.K., Rajaram, M., Indhumathy, M., Saranya, R., Chatterjee, S., 2006. Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC Cell Biol.*7:17.

Tapon-Bretheadie`re, J., Drouet, B., Matou, S., Mourão, P.A.S., Bros, A., Fischer, A.M., 2000. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb. Haemostasis.*84:332–337.

Tongers, J., Roncalli, J.G., Losordo, D.W., 2010. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res.*79, (3):200-206.

Tufan, A.C., Satiroglu-Tufan, N.L., 2005. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets.*5:249-266.

Vu, M.T., Smith, C.F., Burger, P.C., Klintworth, G.K., 1985. An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. *Lab Invest.*53:499–508.

Wang, H.M., Lu, C.Y., Wang, X.H., Bao, Y.L., Meng, X.Y., Wu, Y., Li, Y.X., 2007. Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model. *J Biol Res.*7:93–97.

Yip, G.W., Smollich, M., Götte, M., 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther.*5:2139-2148.

Young, P.P., Vaughan, D.E., Hatzopoulos, A.K., 2007. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis.*49, (6):421-429.

Zammaretti, P., Zisch, A.H., 2005. Adult endothelial progenitor cells renewing vasculature. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*37, (3):493–503.

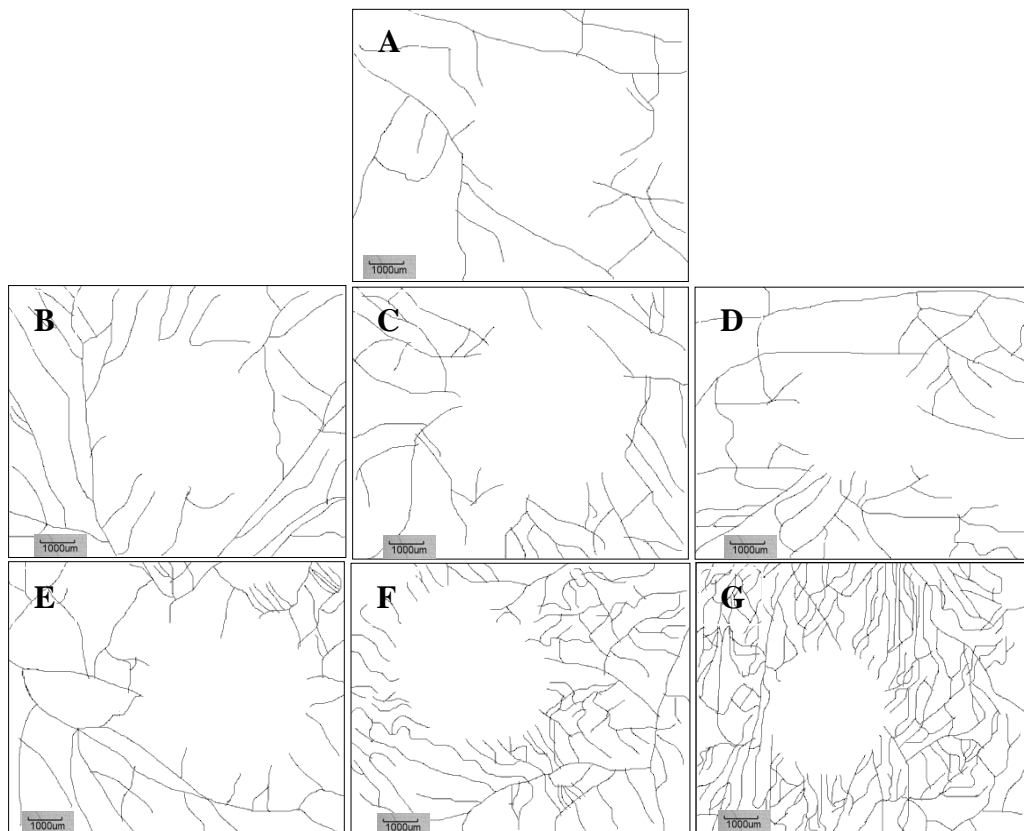


Figure 1. Skeletonized images (background image in white and vessels in black) of the YSM blood vascular network after implantation of methylcellulose disks with different substances. A: Negative control (water, vehicle); B: SC, 0,001 mg/disk; C: SC, 0,003 mg/disk; D: SC, 0,01 mg/disk; E: SC, 0,03 mg/disk. F: SC, 0,1 mg/disk. G: FGF2 (positive control). Final magnification: X 20 (bars: 1000 µm).

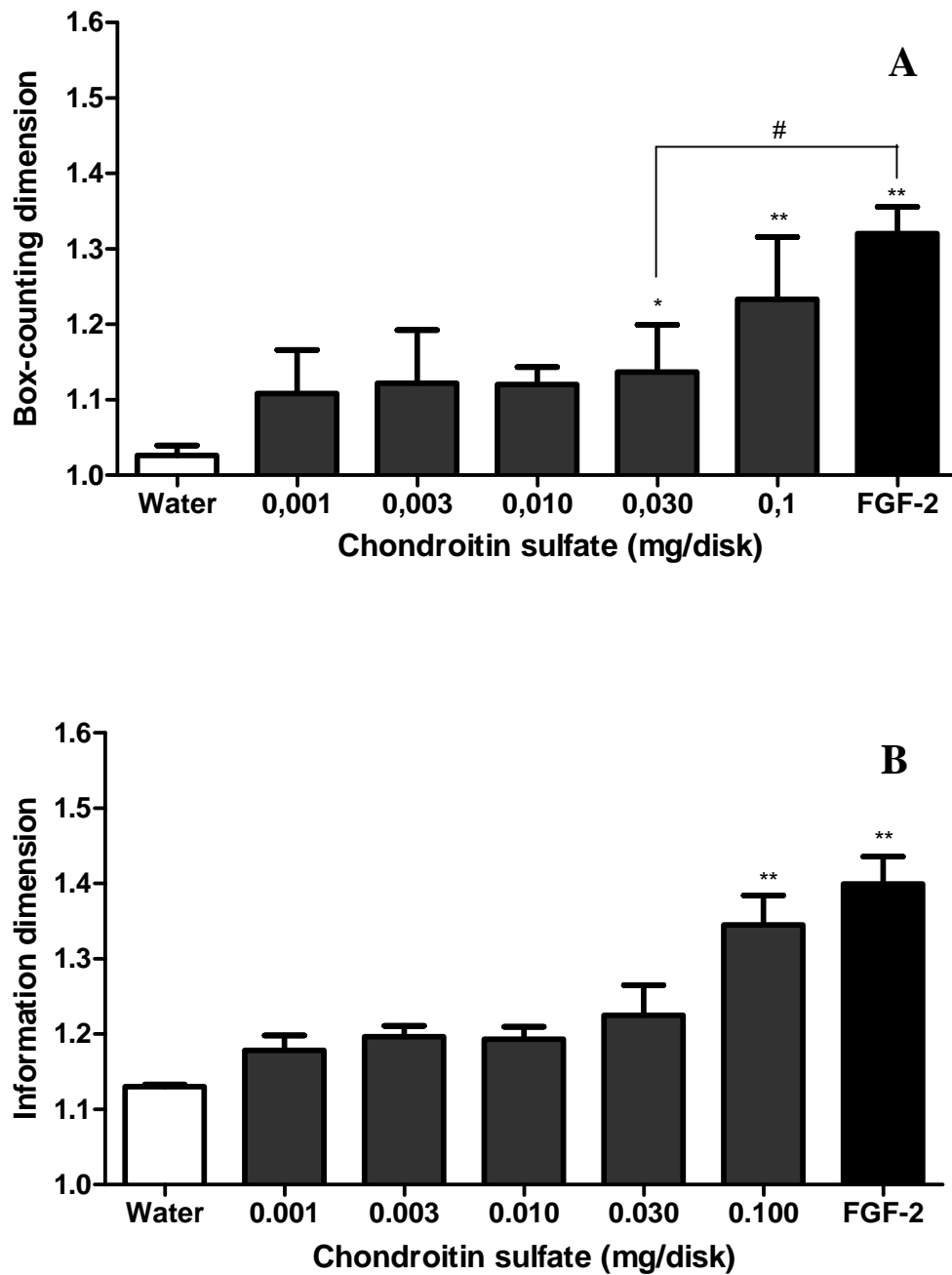


Figure 2. Stimulatory effect of CS (0.001-0.1 mg/disk) on vascularization of the 4-day YSM. Results are quantified for skeletonized images by (A) box-counting (D_{BC}) and (B) information fractal dimension (D_{INF}). The controls were performed with vehicle (water, negative control) and FGF2 (50 ng/disk, positive control). Each bar represents the mean \pm SEM of six eggs. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus negative control; # $p < 0.01$ versus FGF2 (ANOVA and Dunnett as a *post hoc* test).

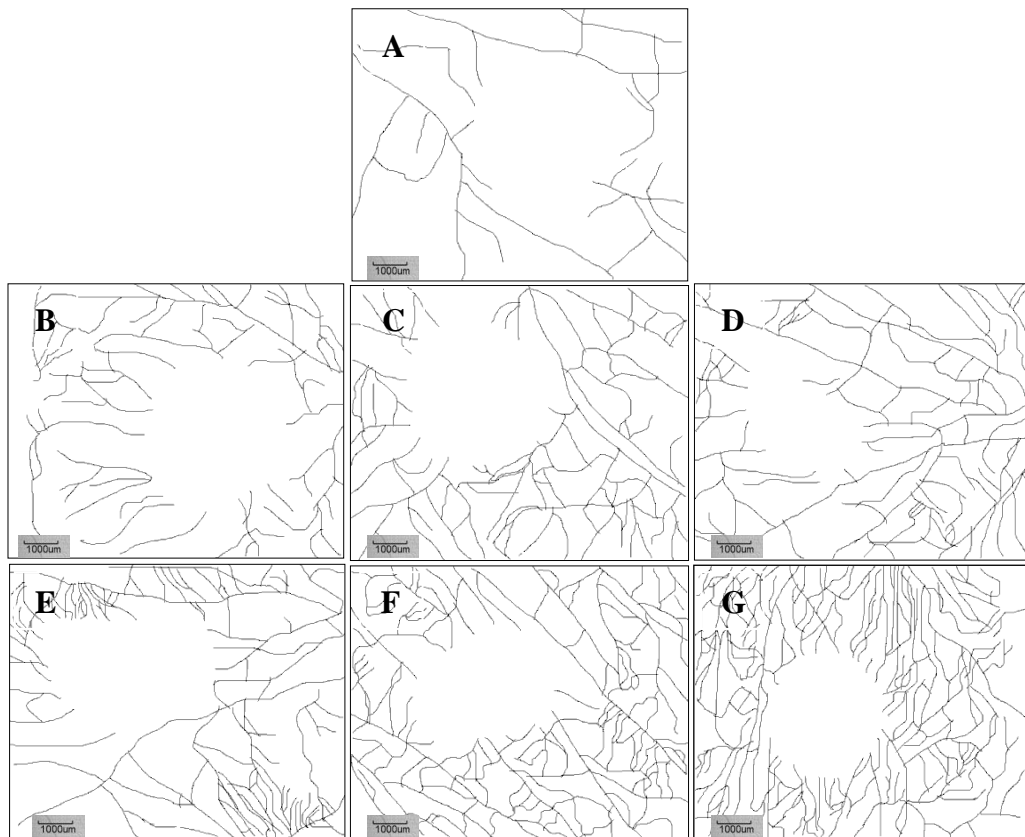


Figure 3. Skeletonized images (background image in white and vases in black) of the YSM blood vascular network after implantation of methylcellulose disks with different substances. A: Negative control (water, vehicle); B: SG, 0.001 mg/disk; C: SG, 0.003 mg/disk; D: SG, 0.01 mg/disk; E: SG, 0.03 mg/disk. F: SG, 0.1 mg/disk; G: FGF (positive control). Final magnification: X 20 (bars: 1000 μm).

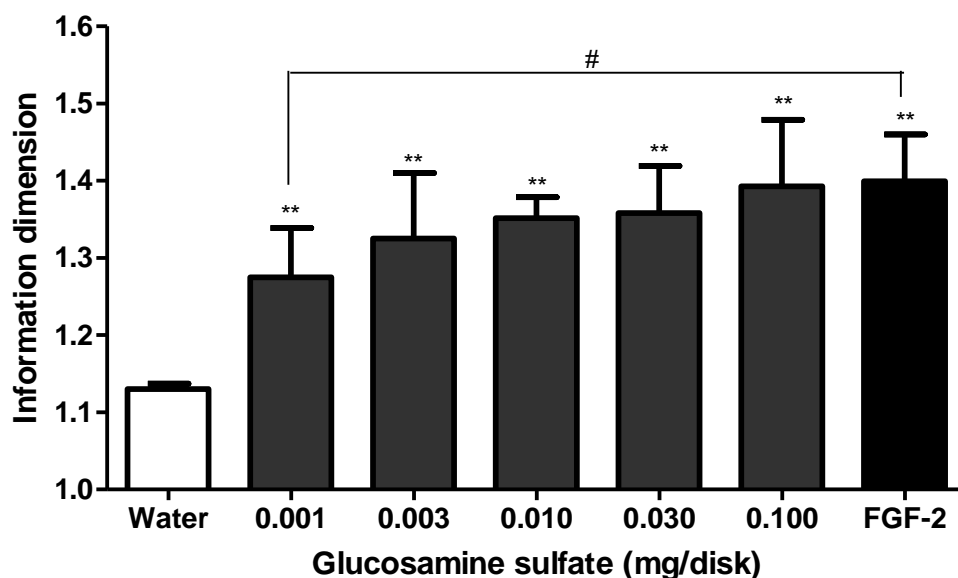
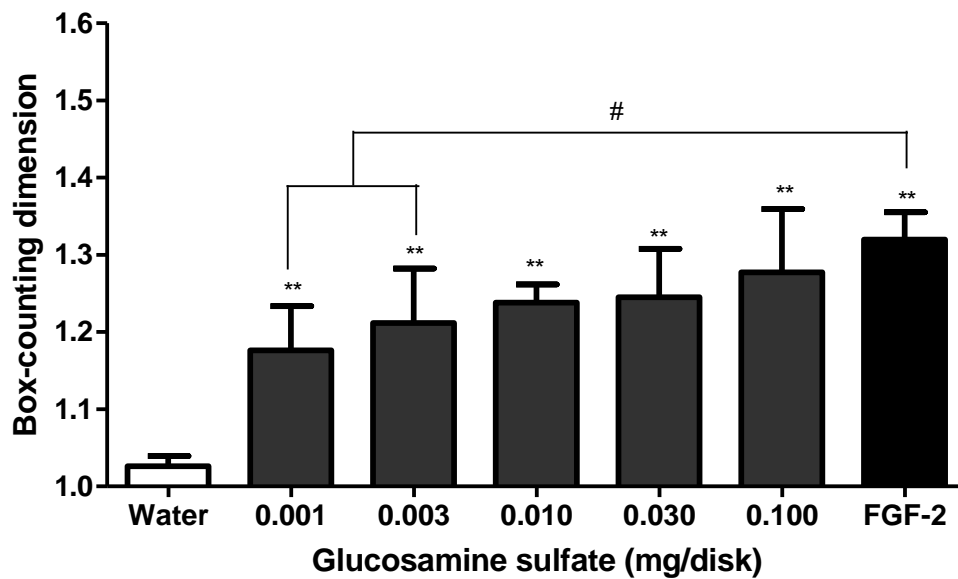


Figure 4. Stimulatory effect of GS (0.001-0.1 mg/disk) on vascularization of the 4-day YSM. Results are quantified for skeletonized images by (A) box-counting and (B) information fractal dimension. The controls were performed with vehicle (water, negative control) and FGF2 (positive control). Each bar represents the mean \pm SEM of six eggs. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; versus negative control; # $p < 0.01$ versus FGF2 (ANOVA and Tukey as a *post hoc* test).

GUIDE FOR AUTHORS (Guia para submissão)

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

Biochemical and Biophysical Research Communications is the premier international journal devoted to the very rapid dissemination of timely and significant experimental results in diverse fields of biological research.

Types of paper

BBRC accepts Short Communications and Mini-Reviews.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the BBRC online submission system <http://ees.elsevier.com/bbrc>. Authors who have questions regarding the electronic submission process should contact the Editorial Office prior to submission (e-mail: bbrc@elsevier.com; telephone: (619) 699-6857).

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it

is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review

process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Peer Review Policy

The practice of peer review is to ensure that good science is published. It is an objective process at the heart of good scholarly publishing and is carried out on all reputable scientific journals. Our Editorial Board therefore plays a vital role in maintaining the high standards of BBRC while ensuring that it retains the speed of publication necessary for a rapid communication journal.

Type of Peer Review

BBRC is a rapid communications journal. As such, the decision to publish an article rests entirely with the handling Editor. Manuscripts are assigned to members of the Editorial Board based on expertise. This Editor may accept the manuscript as it is, send it to a colleague for review, or reject it. Requests for revisions are rare. Should the Editor request revisions, the manuscript will be treated as a new submission.

How long does the review process take?

Authors of manuscripts can expect an accept or reject decision normally within 2 weeks of receipt. Publication will then take place immediately unless the author has, upon submission, requested an embargo.

Mini Reviews

This section includes mini reviews, commentaries, and views on relevant subject matter, not simply short papers. Authors submitting a manuscript for this section should, in a cover letter, indicate that they are "submitting a manuscript for the Mini Reviews section." The authors of mini reviews may, if they wish, include a limited number of annotated references.

Use of wordprocessing software

Please submit your paper in Word Document format. Include a cover letter with your submission to appear before the manuscript. It should be in letter format and address the submission to BBRC, including a brief outline of the manuscript and why you think it is important to the readers of BBRC. The text of the manuscript should be in single-column format and include page numbers. Keep the layout of the text as simple as possible. Please do not include any line numbers or running headers or footers such as the manuscript title or corresponding author name. Please remove any "hidden edits" from your paper prior to submission by using track changes then accept changes. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Manuscript size and length

Manuscripts should be double-spaced throughout, with a minimum of 1-inch margins. The built PDF of the manuscript cannot exceed 3MB in size. The length of the article when published will not exceed 6 printed journal pages, including all figures and tables. To achieve this, the submitted article length must be no greater than 4,600 words and 4 figures (n.b. any figure larger than half a page will be counted as two figures). The 4,600 word count includes the title page, all sections of the manuscript (including the references), and the figure and table legends.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Standards for Reporting Enzymology Data (STRENDA)

This journal follows the recommendations of the STRENDA (Standards for Reporting Enzymology Data) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this pdf file.

All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay must always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters.

First-order and second-order rate constants: see pdf for full instructions.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

You must also list a minimum of 3 authors associated with a cited work before using "et al." in each of your references.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting

applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Research Highlights
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.



Submissions Being Processed for Author Fernanda Borba, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail		Pro-Angiogenic properties of chondroitin sulfate and glucosamine sulfate: a comparative study in vitro and in vivo.	Apr 14, 2012	Apr 14, 2012	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Anexo 2: Pro-Angiogenic properties of chondroitin sulfate and glucosamine sulfate: a comparative study *in vitro* and *in vivo*.

Fernanda Katharine de Souza Lins Borba^{1,2}, Daniela Sousa Coelho², Viviane Aparecida Balvedi Polli², Paulo Fernando Dias², Romildo Albuquerque Nogueira^{1*}

¹Laboratory of Theoretical-Experimental Biophysics and Computing, Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900, Recife, Brazil.

²Laboratório of Studies in Bioactivity and Animal Morphogenesis, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88049-900, Florianópolis, Brazil

*Autor Correspondente: R. A. Nogueira: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, Email: ran.pe@terra.com

Abstract

Two components naturally present in the extracellular matrix (ECM) of joint cartilage, chondroitin sulfate (CS) and glucosamine sulfate (GS), were studied for its proangiogenic effects *in vitro*, assaying human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation and differentiation (tubulogenesis in the Matrigel®) as well as *in vivo* assays carried out in chick embryos and adult mice models. We verified that *in vitro* CS (3 µg/mL), but not GS, significantly stimulated HUVEC proliferation (40%) and differentiation (64%) as compared to control (RPMI-1640 medium as vehicle only). Those effects in HUVEC were not statistically different from the afforded (28% and 53%, respectively) by administration of 50 ng/mL FGF, a well known angiogenic stimulator. The angiogenic activity *in vivo* of CS and GS was evaluated in the chorioallantoic membrane (CAM) assay by means of the fractal analysis model. In the CAM of 8-day chick embryos, CS and GS at concentrations 2.0 mg/implant increased the vessel number as compared to control (water in methylcellulose disks). In the CAM assay, SG showed effects in the group treated at 2.0 mg/implant only. The stimulatory action of CS in the developmental angiogenesis was effectively reproduced on the ongoing vascularity process in the dorsal skin of adult Swiss mice, attained by the Gelfoam® subcutaneous (s.c.) implantation assay. The groups treated by SC (2 mg/implant; Gelfoam plug) exhibited an enhance on vessel number into the plugs (0.52 ± 0.08 g/dL; measured as plug - hemoglobin content). That angiogenic effect was quite similar to the promoted by treatment with FGF2 (50 ng/implant) s.c. in mice ($0,53 \pm 0.1$ g/dL). Treatments performed by GS plugs s.c. implantation exhibit no effects in adult mice. CS, mainly, caused pronounced stimulation of proliferation and tubulogenesis of *in vitro* cultured HUVEC and induced *in vivo* angiogenic responses in both CAM of chick embryos and skin of adult mice without

evident signs of toxicity. We postulate that GS and CS (manly) exert proangiogenic effects because of the biochemical characteristics of its ECM-related constituents and could be further used on clinical situations such as cicatrization and ischemia. Besides, due to its reported properties, the risks involving their uses for treatment of diseases demanding angiogenesis therapeutic modulation should perhaps be reconsidered. On the other hand, more detailed study of mechanisms involving CS and GS actions remains to be elucidated in next studies.

Keywords: Chondroitin Sulfate, Glucosamine Sulfate, angiogenesis, fractal, matrigel, proliferation.

Introduction

The blood vessels formation may involve different processes depending on the age, health condition and tissue (*e.g.*), which are mediated by a large number of proteins, including cell adhesion molecules, extracellular matrix components, proteases, etc (Bischoff, 1995; Carmeliet, 2003). Genetic analysis of the last years have yielded important discoveries, generating important article review about molecular mechanisms related to blood vessel formation (Carmeliet and Collen, 1997; Darland and D'Amore, 1999, 2001; Davis et al., 2011, Murakami, 2012). Angiogenesis is the most known process of vessel formation. The term angiogenesis refers to the sprouting of vessels from the pre-existing vessels and its remodeling; a term used by Embryologists to describe the complex process that transforms the primordial vessels into a mature vascular network. The endothelial cells of both developmental and post-birth blood vessels, may proliferate under certain conditions, but normally remain quiescent for several years. Indeed, in the adult organism, the formation of blood vessels is tightly controlled, and only occurs in certain physiological and pathological conditions, such as monthly reproductive cycle, pregnancy, diabetic retinopathy, and tumor growth (Bergers and Benjamin, 2003; Zammarettia and Zischia, 2005). Due to the fact that angiogenesis is a crucial process in the development of many tumors as well as non neoplastic disturbs, those diseases are also referred as angiogenic diseases and, in the last decades, a number of studies have been focusing the therapeutic properties of antiangiogenic agents (To review, see Folkman, 2007). In the another context, previous studies have also suggested that the stimulation of angiogenesis by pharmaceutical drugs (proangiogenic properties) may be useful to accelerate the scarring of wounds and to promote the

growth of blood vessels in ischemic tissues (Heilmann et al., 2002; Detillieux et al., 2003; Matou et al., 2005).

Angiogenesis is stimulated by a large number of growth factors, including particularly the fibroblast growth factor 2 (FGF2) and the vascular endothelial growth factor (VEGF). FGF2 is secreted primarily by damaged cells in wounded tissue (Arciniegas et al., 2003). VEGF production is regulated in hypoxia conditions, such as those present in ischemic tissues (Liu et al., 2011). Both FGF2 and VEGF display pro-angiogenic activity in animal models and *in vitro* (Asahara et al., 1995; Kano et al., 2005; Bahramsoltani et al., 2010). In response to angiogenic growth factors, endothelial cells degrade the basal membrane of the main vessel, migrate around the interstitial matrix towards the angiogenic stimulus, proliferate for the growth of new blood vessels, and differentiate in contiguous tubular sprouts (tubulogenesis), which later merge into functional capillary sprouts (Marti and Risau, 1999; Ambler et al., 2003). Certain components of extracellular matrix, such as laminin, collagen and fibronectin, contribute to regulate mechanisms of endothelial cells (invasion, migration, proliferation and differentiation) through mobilization of integrins – cell surface proteins whose expression can be induced by angiogenic growth factors (Iivanainen et al., 2003).

The angiogenic effects exerted by FGF2, which belong to a family of heparin-binding growth factors, may be modulated by sulfated polysaccharides (Soker et al., 1994; Rusnati et al., 1996; Burgmeister et al., 2002; Matou et al., 2005; Harmer, 2006). FGF2 has a strong binding affinity for heparin/ heparan sulfate glycosaminoglycans (GAGs) which when covalently bound to core proteins form HS proteoglycans (HSPG). Indeed, membrane HSPG have been characterized as low-affinity binding sites for FGFs that do not transmit a biological signal but rather function as accessory

molecules that regulate FGF binding and the activation of occupied signaling receptors (Yayon et al., 1991; Nugent and Iozzo, 2000). Their removal from the cell surface impairs responsiveness to this growth factor (Rapraeger et al., 1991; Yayon et al., 1991). In some cases extracellular matrix HSPG act as substitutes for their cell-associated counterparts and correctly present the bound FGF2 to its respective receptors (Aviezer et al., 1997; Delehedde et al., 1996). These polysaccharides may also potentiate the angiogenic activity of growth factors, binding to them as described earlier as well by protecting them from enzymatic degradation, and thus promoting the dimerization of the tyrosine kinase receptor (Tardieu et al., 1992; Fannon et al., 2000).

Besides heparin and highly sulfated HS, few other sulfated polysaccharides can influence vascular endothelial cell growth (Stringer, 2006; Iozzo and Sanderson, 2011). Chondroitin sulfate (CS) is a GAG, and glucosamine sulfate (GS) is an amino monosaccharide as a component of GAG, which are naturally present in the extracellular matrix of joint cartilage (Crolle and D'Este, 1980; Fioravanti and Collodel, 2006). Therapeutically, these two sulfated compounds are often associated for treating osteoarthritis and cardiovascular diseases, both in preclinical animal models and in human (Ma et al., 2002; Saito and Munakata, 2004). Due to biochemical properties and similarities with extracellular matrix constituents, we hypothesized that CS and glucosamine sulfate GS, compounds with similar composition to heparin sulfate (Yip et al., 2006), would be effective modulators of angiogenesis. A rising amount of evidences has lately implicated chondroitin sulfate-containing proteoglycans (CSPG) to participate in FGF2 signaling (Bao et al., 2004; Molteni, et al., 1999; Smith et al., 2007). CSPG was shown to modulate the binding of FGF2 to FGFRs, either autonomously in the role of low affinity binding sites (Smith et

al., 2007) or in cooperation with HS chains (Deepa et al., 2004). Therefore, the content and the fine structure of both HS and CS chains might modulate FGF2 binding and FGFR activation in a cell type specific manner (Nikitovic et al., 2008).

Multiple studies have employed different strategies for promoting angiogenesis, such as pre-clinic pharmacologic treatments. In order to investigate the possible effects of CS and GS in the blood vessel formation, in this study we focused on the capacity of chondroitin sulfate (CS) and glucosamine sulfate (GS), in presence and absence of FGF2, to induce (1) *in vivo* embryonic angiogenesis on the chorioallantoic membranes of chick embryos (2) as well in the advanced angiogenesis of the adult mice skin, (3) and in the HUVEC lineage cultures performing *in vitro* assays of viability, proliferation and vascular tubulogenesis in the Matrigel[®] substrate.

Materials and Methods

Materials

The CS and GS used in these experiments were kindly provided by the Phytomare[®] Company (Governador Celso Ramos, SC, Brazil) with purity exceeding 90%.

Cell viability assay

HUVEC cells were seeded (5.0×10^6 cells/well) in RPMI-1640 medium in 96-well plates. After 24 h of incubation, the cells were treated with increasing concentrations of CS, GS and or both (1–3.000 mg/well; 200 mL well volume). The medium was removed 3 days later and the wells were carefully washed several times with PBS (100 mL/well) to remove any remaining test compounds before performing the methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay (Carmichael et al., 1987). Fresh RPMI-1640 medium was added to MTT solution (5 mg/ml in PBS) at a

ratio of MTT solution to medium of 1:10. After incubation in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C for 4 h, the medium was aspirated from the wells and 200 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent was added to each well to dissolve the reduction - product formazan; the plates were agitated on a plate shaker for 5 min. The absorbance at 540 nm was then determined using an automatic ELISA tray reader (Spectra & Rainbow Readers, Tecan). The results are expressed as percent of control. The linearity between the CS, GS and CS + GS concentrations and the number of viable cells was examined. All experiments were performed in triplicate.

Cell proliferation

A suspension of HUVEC cell lineage (20,000 cells/well) in RPMI-1640 medium containing 5% fetal bovine serum (FBS) was added onto 24-well plates precoated with circular coverslips (Glasscyto[®]) previously flamed. The next day, medium was replaced with CS or GS (3, 30 and 300 µg/ml; 300 µl well volume), alone or in association with FGF2 (50 ng/mL). Blank culture medium and FGF2 (50 ng/mL in culture medium) were employed as negative and positive controls, respectively. The plates were then incubated during 72 h. The incorporation of the thymidine analogue, 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU), into DNA served as an index of cellular proliferation; it was incorporated 4 h before the immunocytochemistry reading (working dilution: 1:100). The cells were then fixated with 4% paraformaldehyde for 30 min, and separated by three 5-min washes in PBS with 0.25% Tween 20. After washing, cells were incubated twice with HCl 2N at 37°C (15 min each). The next steps were carried out at room temperature. The cells were permeabilized with 0.25% Triton X-100 during 30 min, and blocked for 40 min in a solution containing 5% FBS and 0.5% normal goat serum. Then, they were incubated during 2 h in

primary antibody solution containing anti-BrdU (Chemicon, MAB 3222), diluted 1:200. After washing, cells were incubated for 1 h in the dark with Alexa Fluor 488-conjugated anti-goat secondary antibody (FITC, Chemicon AP124F, diluted 1:100), and subsequently washed and incubated with DAPI (1:1000) during 30 seconds. The BrdU- or DAPI-labeled cells on coverslips were mounted in Prolong Gold, and examined with a 10X objective in a fluorescence microscope (Olympus, BX41) equipped with a filter system for fluorescein (Alexa Fluor 488, absorption: 494nm and emission: 517nm) and DAPI (absorption: 345 nm and emission: 455nm). Digital photomicrographs were taken from five random fields using the camera (Q-imaging 3.3) and the Q-capture Pro 5.1 software. Visual fields thus imaged were stored digitally and analyzed by manual counting of the stained nuclei. Proliferation of endothelial cells was assessed by quantifying the proportion of cells that had incorporated BrdU under each condition, and the results expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) of three experiments.

Endothelial Tube Formation Assay

The tube formation assay was used to investigate the effect of CS and GS on angiogenesis *in vitro*. In brief, a 96-well plate was coated with 50 μ l liquid Matrigel per well, which was allowed to solidify at 37 $^{\circ}$ C for 50 min. HUVEC were seeded at a density of 15 x 10³ cells per well in 50 μ l complete culture medium and maintained for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Afterwards, 150 μ l of culture medium containing increasing concentrations of CS and GS (3, 30 and 300 μ g/ml), alone or combined with FGF2 (50 ng/mL) were added. Blank medium and FGF2 (50 ng/mL in medium) were employed as negative and positive controls, respectively. Plates were incubated during 24 h at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (enough for

formation of an intact network in the control group). The closed networks of vessel-like tubes were counted using an inverted light microscope at 25x magnification. Incomplete networks were excluded. The wells were viewed and the number of closed networks of vessel-like tubes per well was counted (three different fields were counted per well and averaged), as described by Liao et al. (2003). Data were expressed as a percentage number of microtubes relative to control wells.

Animals

Male specific pathogen-free Swiss 2-month-old mice were acquired from the Central Biotery of Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, Brazil) and housed in a light-controlled room (lit from 7:00 A.M. to 7:00 P.M.) at a room temperature of $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ and fed on sterilized animal chow and water *ad libitum*.

Pathogen-free fertilized chicken eggs (Ross strain, n = 6) were supplied by poultry producers (Tyson S.A., SC, Brazil).

All animal studies were carried out in accordance with the procedures outlined in protocol number PP00586/2011/CEUA/UFSC, approved by the Local Committee for the Care and Ethical Use of Animals in Research (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil).

CAM assay

The ability of CS and GS to stimulate angiogenesis was determined by the choriollantoic membrane assay (CAM), performed according to the method presented by Dias et al. (2008). Pathogen-free fertilized chicken eggs (Ross strain) were furnished by a local commercial incubatory and initially incubated at 37.5°C and 70% air moisture. After 48 h the eggs were removed from the incubator, and a window (10

mm diameter) was opened in the egg shell, at a position adjacent to the embryo. The treatment *in ovo* was performed by implanting disk-shaped methylcellulose supports (7.5 μ l volume, 3-mm diameter; one disk per embryo) impregnated with CS, GS and FGF2 (positive control) on the outer one-third of the 6-day old choriollantoic membrane (CAM), near the embryo, where blood capillaries were still growing (CAM assay). After the manipulations, the windows were closed with black binding cellophane tape, and the eggs were returned to the incubator until the 8th day (E8 embryonic day). The concentration of CS and GS administered to vascular membranes by means of the methylcellulose (MC) disk supports ranged from 0.02 to 2.00 mg/disk. Disks containing fibroblast growth factor-2 (FGF2; 50 ng/disk) and blank methylcellulose disks (ultrafiltered water as solvent; pH 7.2) were used as positive and negative controls, respectively. For each egg, images were captured with a Motic 1000 1.3 MP camera coupled to a stereomicroscope (20x). The vessels in the region around the limit of MC disk were quantified through the calculation of the fractal dimension.

Image segmentation

The digital images were processed to calculate the fractal dimension of the vascular network as follows: first, the images were segmented manually using Microsoft[®] Paint to separate the blood vessels from the rest of the images. Each vessel was traced by a line with thickness of one pixel, after which the images were binarized (background in black and vessel in white), also using Paint software[®]. Finally, the software Benoit[™] 1.3 Fractal Analysis System was used to calculate the fractal dimensions of the blood vessels.

Fractal analysis

The method used to calculate the fractal dimension was Box Counting Dimension (D_{BC}). The calculation of D_{BC} was carried out by Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System. The D_{BC} is obtained by covering up the fractal object with $N(r)$ boxes containing at least one point of the fractal object. This procedure is repeated with boxes of different sizes and draws up a double log graph of $N(r)$ in function on the sides of boxes r (Kunick et al., 2009). The slope of this graph with inverted signal is the box-counting dimension, which can be defined formally by the following expression (KUNICKI et al., 2009):

$$D_{BC} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \epsilon) - \log N(r)}{\log(r + \epsilon) - \log(r)} \right]$$

Gelfoam plug assay

For evaluating the formation of blood vessels in adults, male swiss mice of 8 weeks old with an average body weight of 27 ± 2 g were used. The groups were treated with CS or GS (2 mg/animal) and 50 ng FGF2 (50ng/animal), alone or in association. PBS (vehicle) and FGF2 (50 ng/animal) were used, respectively, as negative and positive controls. Each compound or combination was adsorbed (50 μ L) in a sterile collagen gelatinous implant (plug; Gelfoam® UpJohn; 6-mm diameter x 3 mm). Each Gelfoam plug was implanted subcutaneously (s.c.) into the rear right flank of a mouse ($n = 5 - 8$). The mice were killed 2 weeks later by CO_2 inhalation and the skin was carefully pulled away to expose the intact Gelfoam plug. The amount of hemoglobin (Hb) inside the Gelfoam plug was measured using Drabkin reagent as a quantifiable index of blood vessel formation (Drabkin et al., 1932). The concentration of Hb is

expressed as milligrams per deciliter and calculated based on an Hb standard measured simultaneously using the following equation: sample absorbance/standard absorbance x10, as described by Lee et al. (2003) and Dias et al. (2005).

Statistical analysis

Experimental data were summarized and expressed as mean \pm SEM, and evaluated by analysis of variance (ANOVA) using the software *Statistica 7.0*. Along with the ANOVA results, an analysis of mean separation was performed by the *post hoc* test of Tukey, for which values of $p < 0.05$ are considered statistically significant.

Results

Effects of CS and GS on in vitro viability

To investigate the effect of CS and GS, we first examined the effect of increasing concentrations of CS and GS, individually or combined (3 – 3.000 $\mu\text{g/ml}$) on HUVEC lineage cell viability by the MTT toxicity assay. As demonstrated in Fig. 1, after a 48 h treatment, the results of the MTT assay showed that the viability of HUVEC was not significantly changed by the above treatments within 1-10 $\mu\text{g/ml}$. Only when the treatment was increased to 30-3000 $\mu\text{g/ml}$, the HUVECs were observed to have reduced viability. In this interval, CS and GS reduced the cell viability to respectively $66 \pm 1.2 - 65 \pm 2.5\%$ and $60 \pm 2.41 - 57 \pm 2.5\%$ compared to control ($p < 0.05$). In the highest tested interval (1000-3000 $\mu\text{g/ml}$), CS reduced the viability of HUVECs by $62 \pm 2.6 - 53 \pm 2.9\%$, while GS in the same interval reduced it by $45 \pm 2.3 - 36 \pm 1.8\%$ (Figure 1). Figure 1 shows that there was no additive effect for concomitant administration of CS and GS in all tested concentrations, that is, the association of

CS and GS did not show significant differences compared to individual administrations. Interestingly, the co-administration treatment was less efficient, as the amount of viable cells was only significantly reduced for 100 µg/mL concentrations, about three times higher than the necessary concentration to reduce viability in individual treatments.

Figure 1

HUVEC proliferation in BrdU assay

Next, we investigated the effect of CS and GS on the proliferation of HUVECs through BrdU incorporation, as well as a tubulogenesis on Matrigel support assay.

In the immunohistochemistry reaction, the positive cells, marked with BrdU displayed green color after UV radiation. As shown in Fig. 2 A and B, HUVEC proliferation was increased by 40% with CS (3 µg/mL) and by 50% by FGF2 compared to control ($p < 0.05$), suggesting that increase of DNA synthesis might be a significant contributor in CS-mediated cell growth increase in HUVEC. However, concentrations greater than 3 µg/mL displayed a reduction in the number of proliferative cells, which did not significantly differ from control ($p < 0.05$). The association of CS and FGF2 had no effect on HUVEC proliferation (Fig 2 B). Compared to untreated controls, standalone GS had no effect on cell proliferation, but GS (300 µg/mL) + FGF2 reduced HUVEC proliferation by 85% ($p < 0.01$).

Figure 2

Capillary tube formation on Matrigel by HUVEC

Furthermore, for evaluating the effect of CS and GS on the angiogenic ability of HUVECs, we treated HUVECs with 3, 30 and 300 $\mu\text{g/mL}$ of CS and GS for 24 h in Matrigel supports. When plated on Matrigel, HUVECs underwent rapid reorganization and subsequently formed capillary-like structures. The formation of branched structures was observed in the control group (Figure 3). HUVEC pretreated with standalone CS (3 $\mu\text{g/mL}$) and FGF2 did form tubular-like structures after 24 h on Matrigel with increased tube formation in 64% and 53%, respectively, compared to untreated control cells ($p < 0.05$). When added to FGF2, CS (300 $\mu\text{g/mL}$) inhibited HUVEC differentiation as compared to standalone FGF2 (Figure 3) ($p < 0.01$). GS, both standalone and with FGF2, had no effect on the capillary-like network organization.

Figure 3

Angiogenesis in *G. domesticus* embryos

In this study, the CAM assay was used to determine whether glucosamine and chondroitin sulfates displayed pro-angiogenic activity. We evaluated the vascularization around the methylcellulose disk in chick embryo CAM (implanted after 6 days of preliminary egg incubation: E6).

Figures 4 and 5 show the results of fractal dimensions via box counting (D_{BC}) for the groups treated with CS and GS, respectively, in 8-day old embryos (E8; 192 hours of egg incubation).

Figure 4

Figure 5

Figures 4 and 5 display a significant increase ($p < 0.05$) in the amount of blood vessels compared to control in the highest tested concentration of CS and GS (2 mg/disk), expressed by the D_{BOX} values 1.30 ± 0.03 e 1.28 ± 0.04 , respectively. In addition, this concentration of CS and GS had a similar vessel promoting effect to the well known angiogenic factor FGF2 ($D_{\text{BOX}} = 1.34 \pm 0.03$). However, no significant difference ($p < 0.05$) was observed for the fractal dimensions of CS and GS concentrations below 2 mg/disk, compared to the control group.

Angiogenesis in adult *M. musculus*

In order to test whether the pro-angiogenic effects of CS and GS, previously observed in embryos, would also be observed in adults (advanced angiogenesis), we conducted a subcutaneous Gelfoam assay in mice (Figure 6). In this experiment, we evaluated the formation of blood vessels based on the amount of hemoglobin in the Gelfoam plug implanted under the animals' skin, as previously described in the Materials and Methods topic.

Figura 6

At the 15-th experiment day, the control group with the PBS-treated Gelfoam plugs visibly displayed new blood vessels, with the amount of hemoglobin (Hb) in the plug being equivalent to 0.20 ± 0.07 g/dL. However, the Gelfoam plugs containing FGF2 (positive control) displayed a higher Hb content (0.53 ± 0.1 g/dL), a significant increase ($p < 0.01$) compared to control (Figure 6).

Still from Figure 6, much like observed for FGF2, the group treated with CS (2 mg/implant) displayed a notable vessel growth, expressed by the hemoglobin content (0.52 ± 0.08 g/dL), significantly ($p < 0.01$) higher than the control group. It is important to note, however, that the co-treatment with CS (2 mg/implant) and FGF2 resulted in a lowered Hb content (0.11 ± 0.04 g/dL), indicating that the important pro-angiogenic effect mediated by both isolated compounds was essentially nullified in the concomitant administration. It was also observed that standalone GS did not increase the amount of blood vessels (Hb content), however, the co-administration of GS and FGF2 reduced the Hb content to 0.20 ± 0.11 g/dL ($p < 0.01$).

Discussion

Drug-mediated angiogenesis may be used to speed scarring and tissue healing, promoting the growth of blood vessels in ischemic tissues (Heilmann et al., 2002; Detillieux et al., 2003). In the present study, we investigated pro-angiogenic effects of CS and GS in models *in vitro* and *in vivo*. Our results show that CS promoted angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. However, GS increased angiogenesis only in the chick CAM assay. The viability assay results with CS in HUVECs (Figure 1) suggest a partial cytotoxic effect (around 50%) only in the highest tested concentration (3000 μ g/mL), while GS displays cytotoxic effects at a lower concentration (1000 μ g/mL). Thus, CS and GS display low toxicity to human cells.

This result is in accordance to the works of Hathcock and Shao (2007), which concluded that GS and CS are safe for long term use with little or no reported health risks or adverse side effects.

The results of the HUVEC proliferation and tubulogenesis assays (Figure 2 and Figure 3) show that, in absence of angiogenic growth factor, CS (3 $\mu\text{g/mL}$) significantly stimulated HUVEC proliferation and differentiation, even displaying values similar to FGF2, whereas GS had no effect. A similar finding has been documented in some studies, such as enhanced HUVEC proliferation induced by oversulfated exopolysaccharide (Matou et al., 2005), Human bone marrow endothelial cells differentiation stimulated by perlecan (Muthusamy et al. 2010). Furthermore, the combination of 300 $\mu\text{g/mL}$ CS with FGF2 showed a significant reduction in blood vessel formation (tubulogenesis assay - Figure 3), but that same treatment did not exert any effect on endothelial cell proliferation (Figure 2). The inverse was observed for GS (300 $\mu\text{g/mL}$) + FGF2, which inhibited cell proliferation compared to standalone FGF2, but had no effect on vascular tubules. Similar differential effects on different steps of angiogenesis have also been reported for other polysaccharides. For example, in the presence of FGF2, fucoidan (of algal origin) enhances vascular tube formation on Matrigel but has no effect on endothelial cell proliferation or migration (Giroux et al., 1998; Matou et al., 2002). Likewise, tecogalan (of bacterial origin) inhibits endothelial cell migration and tube formation induced by VEGF, but has no effect on cell proliferation (Sakamoto et al., 1995). According to Matou et al. (2005), an exopolysaccharide (from a mesophilic bacterium) in the presence of FGF2 and VEGF, promotes *in vitro* angiogenesis by its positive effects on vascular tube formation and cell proliferation despite its inhibitory effect on FGF2- induced cell migration.

In the CAM assay, which may be the best documented model for *in vivo* angiogenesis, (Yaconpoulos et al., 2000; Nguyen et al., 1994), CS and GS promoted a significant increase in the amount of vessels only in the highest tested concentration (2 mg/disk) (Figures 4 and 5). However, this important pro-angiogenic effect of CS (2 mg/implant) was confirmed in the adult angiogenesis assay, performed in mice. In this assay, it was observed that standalone CS promotes the formation of neovessels, expressed in Hb content, into the Gelfoam plug from pre-existing endothelium (Figure 6). On the contrary, standalone GS (2 mg/implant) did not cause a significant increase in vessel formation in the mouse, which indicates CS being more effective, and displays selectivity of effects in relation to different study models. Both CS and GS were able to nullify the potent angiogenic effect of FGF2 when administered in conjunction with this factor in the same implant, which confirms the results we obtained *in vitro* (proliferation e tubulogenesis). Glycosaminoglycans (GAG) and sulfated polysaccharides may act via FGF2 and VEGF (Yayon et al., 1991; Rahmoune et al., 1998; Matou et al., 2005; Dias et al., 2005). A rising amount of evidence has lately implicated chondroitin sulfate (CS) to participate in FGF2 signaling (Bao et al., 2004; Smith et al., 2007). CS was shown to modulate the binding of FGF2 to FGFRs, either autonomously or in the role of low affinity binding sites (Smith et al., 2007). Therefore, the content and the structure of CS chains might modulate FGF2 binding and FGFRs activation in a cell type specific manner (Nikitovic et al., 2008). Previous studies have revealed both stimulatory and inhibitory effects of various GAG on growth of different cells as well FGF2 signaling and it has been suggested that the GAG structure is pivotal in those effects (Bao et al., 2004; Deepa et al., 2004; Delehede et al., 1996; Ling et al., 2006; Smith et al., 2007). Depending on their particular structure and placement, on the cell surface and/or

extracellular matrix (Nugent and Iozzo, 2000), certain sulfated carbohydrates can effectively sequester FGF2, thus preventing activation of FGF receptors, leading to a sustained inhibition of angiogenesis (Dias et al., 2005). However, other sulfated macromolecules could also be able to bind to heparin binding growth factors (such as FGF2 and VEGF) and thus increase their pro-angiogenic properties. The high molecular weight due to sulfate content, for example, is a key determinant of polysaccharide modulation of angiogenesis (Matou et al., 2005). CS from different animal cartilages is sulfated in the 4-O- and 6-O-positions (Seno et al., 1975). In fact, sulfated carbohydrate rich in primarily 4-O-sulfated regions, such as CS, were shown to actively bind FGF2 and induce its signaling (Taylor et al., 2005) suggesting that CS might exogenously bind to FGF2 simulating angiogenesis. On the other hand, in accordance with the findings in the present study, co-administration of CS or GS and exogenous FGF2 not only did not increase the angiogenesis-stimulant activities afforded by the standalone administration of that growth factor, but could be directly downregulating endothelial cell proliferation and differentiation. It is possible to suggest the occurrence of a competitive mechanism (caused by antagonism or partial agonist behavior) amongst the sulfated compounds under study and administered FGF2, which could then not allow more FGF2–FGFR binding, blocking the related endothelial cell functions. More details on the mechanisms involving CS and GS actions in the angiogenesis process remain to be further elucidated. Nonetheless, due to the risks involving angiogenesis induction, their uses for some clinic treatments such as those requiring therapeutic angiogenic blockade suggest caution.

In conclusion, this study demonstrated that CS (mainly) and GS display consistent pro-angiogenic properties *in vitro* (HUVEC proliferation and tubulogenesis) as well as

in *vivo* (developmental and ongoing angiogenesis). Those effects are related and may rather be ascribed to their chemical structures, which are characteristic of ECM-related constituents. The graded and effective action of CS in vessel formation and the relatively low cytotoxicity suggest its potential use in providing alternate strategies for clinical situations which demand vascular recovery, such as the tissue repair, ischemia or related dysfunctions.

Acknowledgments

The authors would like to thank the valuable collaboration in the development of this work from Dr. Marcelo Manaschin and Dr^a. Maria Beatriz da Rocha Veleirinho (Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory/CCA, – UFSC). We are grateful to Giovanni Loss and Lisiê Silva for their technical assistance. This research was supported by the Brazilian agencies CNPq, CAPES and FACEPE (Fellowships).

References

Ambler, C.A., Schmunk, G.M., Bautch, V.L. 2003. Stem cell-derived endothelial cells/progenitors migrate and pattern in the embryo using the VEGF signaling pathway. *Dev Biol.* 257, 205-219.

Arciniegas, E., Parada, D., Graterol, A. 2003. Mechanically altered embryonic chicken endothelial cells change their phenotype to an epithelioid phenotype. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 270, (1):67-81.

Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L.P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N. et al. 1995. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, 365–371.

Aviezer, D., Iozzo, R. V., Noonan, D. M., & Yayon, A. 1997. Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol Cell Biol.* 17, 1938–1946.

Bahramsoltani, M., De Spiegelaere, W., Janczyk, P., Hiebl, B., Cornillie, P., Plendl, J. 2010. Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF2 in two

different human endothelial cultures – an all-in-one assay. *Clinical Hemorrhology and Microcirculation* 46, (2-3): 189-202.

Bao, X., Nishimura, S., Mikami, T., Yamada, S., Itoh, N., & Sugakahara, K. 2004. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of l-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. *J Biol Chem.* 279, 9765–9776.

Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.

Bischoff, J. 1995. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 5 (2), 69-74.

Burgermeister, J., Paper, D.H., Vogl, H., Linhardt, R.J., Franz, G. 2002. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Carbohydr Res.* 337, 1459–1466.

Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9, 653-660.

Carmeliet, P., Collen, D. 1997. Genetic analysis of blood Vessel formation: Role of Endothelial versus Smooth muscle cells. *Trends Cardiovas Med.* 7, (8):271-281.

Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minn, J.D., Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936–942.

Crolle, G., D'Este, E. 1980. Glucosamine sulphate for the management of arthrosis. A controlled clinical investigation. *Curr Med Res Opin.* 7, 104–109.

Davis, G.E., Stratman, A.N., Sacharidou, A., Koh, W. 2011. Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *Int. Rev Cell Mol Biol.* 288,101-165.

Darland, D.C., D'Amore, P.A., 1999. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J. Clin. Invest.*103, (2):157–158.

Darland, D.C., D'Amore, P.A., 2001. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52,107-49.

Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., & Sugahara, K. 2004. Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J. Biol Chem.* 279, 37368–37376.

Delehedde, M., Deudon, E., Boilly, B., Hondermarck, H. 1996. Heparan sulphate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 229, 398–406.

Detillieux, K.A., Sheikh, F., Kardami, E., Cattini, P.A. 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res.* 57, 8–19.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Maraschin, M., Ferreira, G., Gagliardi, A.R.T., Ribeiro Do Valle, R.M. 2008. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc Res.* 75, 34-44.

Dias, P.F., Siqueira, J.M., Vendruscolo, L.F., Neiva, T.J., Gagliardi, A.R., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R.M. 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 436–446.

Drabkin, D.L., Austin, J.H. 1932. Spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719-722

Fannon, M., Forsten, K.E., Nugent, M.A. 2000. Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: a model for regulation of cellular response. *Biochem.* 39, 1434–45.

Fioravanti, A., Collodel, G., 2006. In vitro effects of chondroitin sulfate, *Adv. Pharmacol.* 53, 449–465.

Folkman, J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 6(4), 273-286.

Giroux, J.L., Matou, S., Bros, A., Tapon-Brethaudiere, J., Letourneur, D., Fischer, A.M. 1998. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. *Eur. J. Cell. Biol.* 77, 352-9.

Harmer, N.J. 2006. Insights into the role of heparin sulphate in fibroblast growth factor signaling. *Biochem Soc Trans.* 34, 442-445.

Hathcock, J.N., Shao, A. 2007. Risk assessment for glucosamine and chondroitin sulfate. *Regul Toxicol Pharmacol.* 47, 78–83.

Heilmann, C., Beyersdorf, F., Lutter, G. 2002. Collateral growth: cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg.* 10, 570–578.

Iozzo, R.V., Sanderson, R.D. 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 15, (5):1013-31.

Iivanainen, E., Kahari, V.M., Heino, J., Elenius, K. 2003. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc. Res. Tech.* 60, 13–22.

Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 930-934.

- Lee, Y.S., Yang, H.O., Shin, K.H., Choi, H.S., Jung, S.H., Hoon, S., Kim, Y.M., Oh, D.K., Linhardt, R.J., Kim, Y.S. 2003. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur. J. Pharmacol.* 465, 191-198.
- Ling, L., Murali, S., Dombrowski, C., Haupt, L. M., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., et al. 2006. Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells. *J Cell Physiol.* 209, 811–825.
- Liu, L., Yu, Q., Lin, J., Lai, X., Cao, W., Du, K., Wang, Y., Wu, K., Hu, Y., Zhang, L., Xiao, H., Duan, Y., Huang, H. 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.* 20, (11):1961-71. Epub 2011. Mar 30.
- Marti, H.H., Risau, W. 1999. Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb. Haemost.* 82, 44–52.
- Matou, S., Helley, D., Chabut, D., Bros, A., Fischer, A.M. 2002. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* 106, 213-21.
- Matou, S., Collic-jouaul, S., Galy-fauroux, I., Ratiskol, J., Sinquin, C., Guezennec, J., Fischer, A.M., Helley, D. 2005. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochem Pharmacol.* 69, 751–759.
- Mitsunobu, R., Kano, Y.M., Caname, I., Shigeru, I., Tetsuro, W., Yasuyoshi, O., Kohei, M. and Keiji, M. 2005. VEGF-A and FGF2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR signaling. *J Cell Sci.* 118, 3759-376.
- Molteni, M., Modrowski, D., Hott, M., & Marie, P. J. 1999. Alterations of matrix- and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. *Cell Tissue Res.* 295, 523–536.
- Murakami, M. 2012. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int. J. of Vasc. Medicine.* 2012, 2012:293641.
- Muthusamy, A., Cooper, C.R, Gomes-Jr, R.R. 2010. Soluble perlecan domain enhances vascular endothelial growth factor-165 activity and receptor phosphorylation in human bone marrow endothelial cells. *BMC Biochem.* 11, 43.
- Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N. 2008. Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 72–83.

Nugent, M.A., Iozzo, R.V. 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32, 115–120.

Nguyen, M.; Shing, Y.; Folkman, J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res.* 47, 31–40.

Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., & Fernig, D. G. 1998. Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate. *J Biol Chem.* 273, 7303–7310.

Rapraeger, A. C., Krugka, A., & Olwin, B. B. 1991. Requirement of heparin sulphate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Sci.* 252, 1705–1708.

Rusnati, M., Presta, M. 1996. Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycan. Biological implications in neovascularization. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26, 15–23.

Saito, A., Munakata, H. 2004. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. *Electrophoresis* 25, 2452–2460.

Soker, S., Goldstaub, D., Svahn, C.M., Vlodaysky, I., Levi, B.Z., Neufeld, G. 1994. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1339–1347.

Stringer, S.E. 2006. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 34, (3):451-3.

Tardieu, M., Gamby, C., AVRAMOGLU, T., Jozefonvicz, J., Barritault, D. 1992. Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *J. Cell. Physiol.* 150, 194–203.

Taylor, K. R., Rudisill, J. A., & Gallo, R. 2005. Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem.* 280, 5300–5306.

Sakamoto, T., Ishibashi, T., Kimura, H., Yoshikawa, H., Spee, C., Harris, M.S., et al. 1995. Effect of tecogalan sodium on angiogenesis in vitro by choroidal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1076-83.

Seno, N.; Anno, K.; Yaegashi, Y., Okuyama, T. 1975. Microheterogeneity of Chondroitin Sulfates from Various Cartilages. *Connect Tissue Res.* 3(1), 87-96.

Smith, S. M. L., West, L. A., Govindraj, P., Zhang, X. D., Ornitz, M., Hassel, J. R. 2007. Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF2 to FGF receptors. *Matrix Biol.* 3, 175–184.

Yancopoulos, G.D.; Davis, S.; Gale, N.W.; Rudge, J.S.; Wiegand, S.J, Holash, J 2000. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242–248.

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., & Ornitz, D. M. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848.

Yip, G.W., Smollich, M., Götte, M. 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol. Cancer. Ther.* 5, 2139-2148.

Zammarettia, P., Zischa, A.H. 2005. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 493-503.

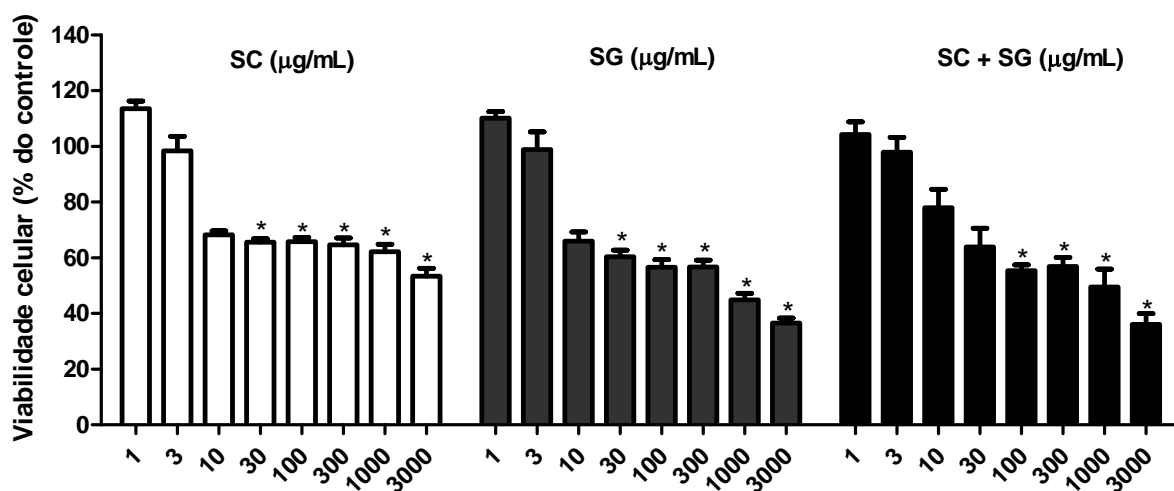
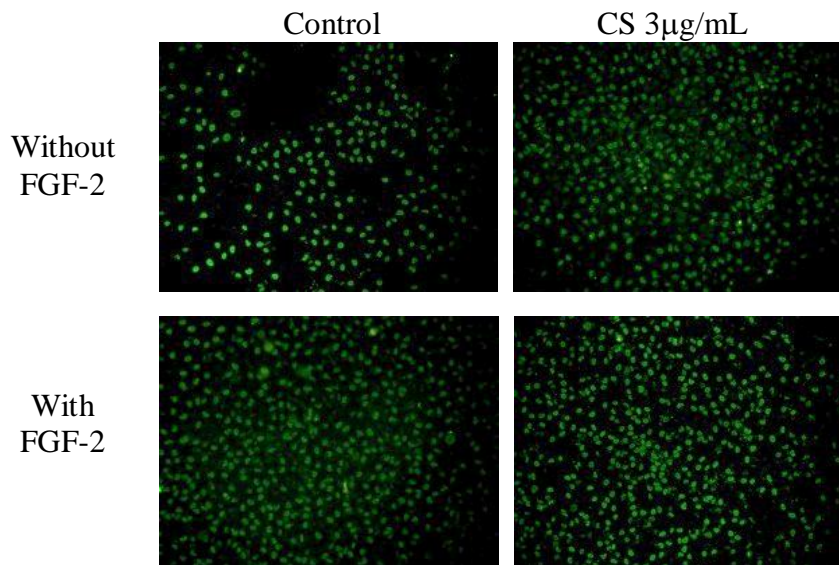
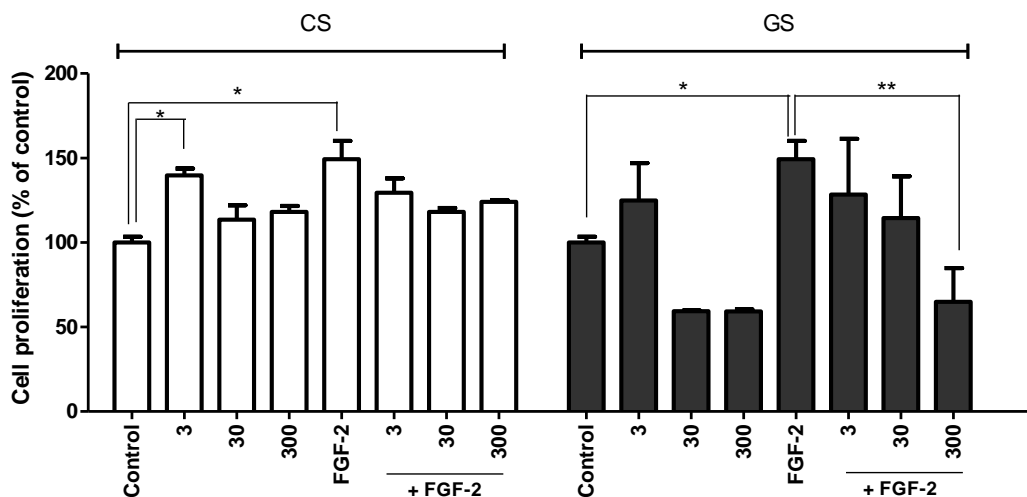


Figure 1. Effects of CS and GS (1-3000 µg/well), alone and in association, on HUVEC line cell viability (5.0×10^6 cells/well) After 48h of exposition to the test compounds, the percentage of viable cells was determined by incubation (4h) with MTT. The experiments were done in triplicate, and the results are expressed as percentage of the control group (medium: RPMI-1640). The columns denote statistically significant differences with $p < 0.05$, in relation to the control group (ANOVA followed by Tukey test).



(A)



(B)

Figure 2. Effect of the SC, GS in the absence or in the presence of FGF2 na proliferação das células HUVEC avaliadas pela técnica de BrdU. Experiments were performed as described in Materials and methods section. (A) Photographs show BrdU-positive HUVEC previously treated without FGF2 (top row) or with FGF2 at 50 ng/ml (bottom row), in the absence (left column) or in the presence of CS at 3 mg/ml (right column). Aumento de 10X. (B) The quantification of BrdU-positive cells in the presence of SC and GS (3, 30, 300 µg/mL), alone or plus FGF2 (50 ng/mL) is shown in the histogram. The results are expressed as percentage of the cells in the control group. Each bar represents the mean ± standard deviation for experiments done in duplicates. The statistics were performed through analysis of variance (ANOVA) in conjunction with the Tukey test. * p<0.05, ** p<0.01.

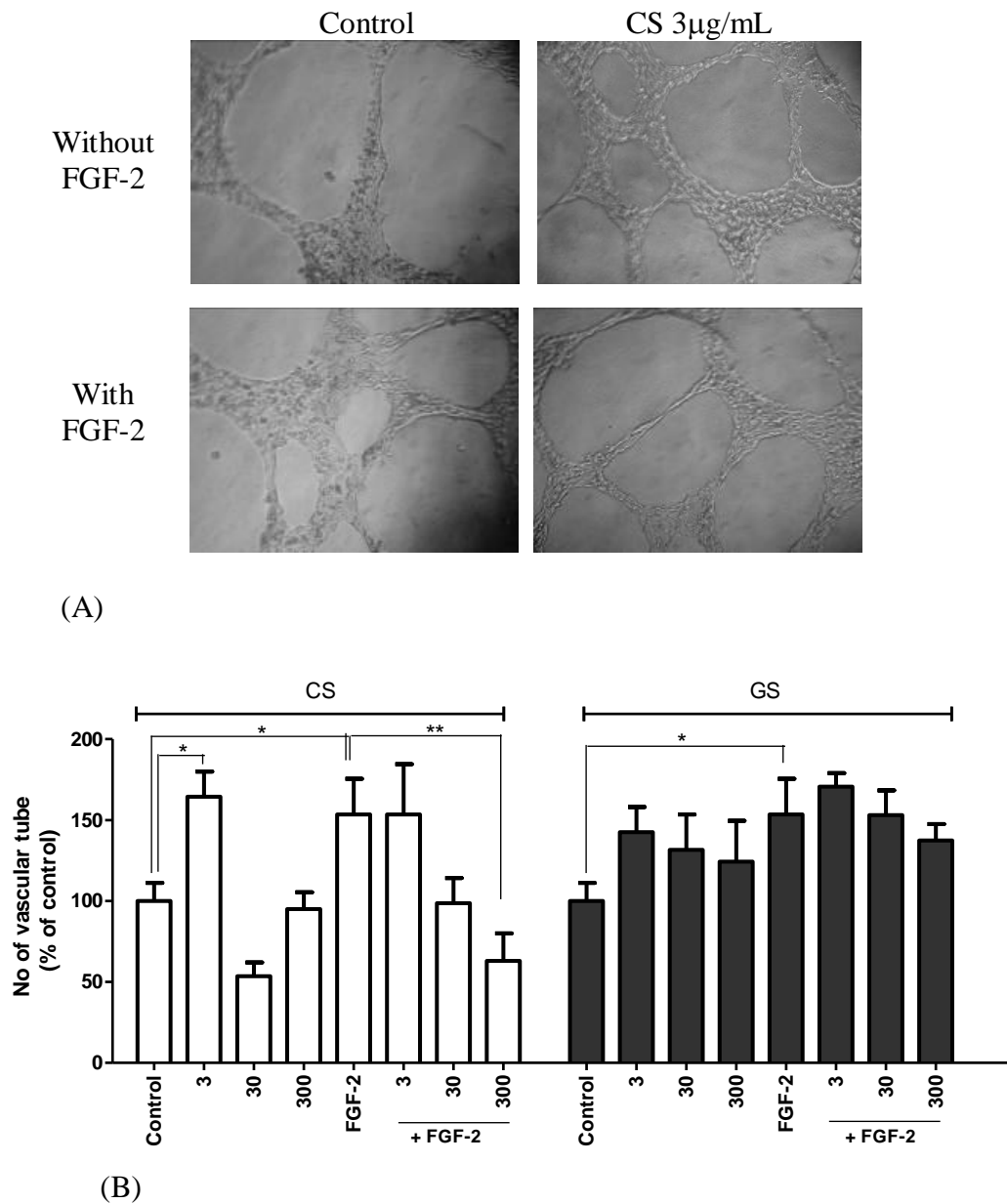


Figure 3. Effect of the SC, GS in the absence or in the presence of FGF2 on the tube formation on Matrigel. Experiments were performed as described in Materials and methods section. (A) Photographs show vascular tube formation by HUVEC previously treated without FGF2 (top row) or with FGF2 at 50 ng/ml (bottom row), in the absence (left column) or in the presence of CS at 3 mg/ml (right column). Aumento de 25X. (B) The quantification of SC and GS (3, 30, 300 mg/mL), alone or plus FGF2 (50 ng/mL) on Capillary-like Tube Formation is shown in the histogram. The results are expressed as percentage of the cells in the control group. Each bar represents the mean \pm standard deviation for experiments done in duplicates. The statistics were performed through analysis of variance (ANOVA) in conjunction with the Tukey test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

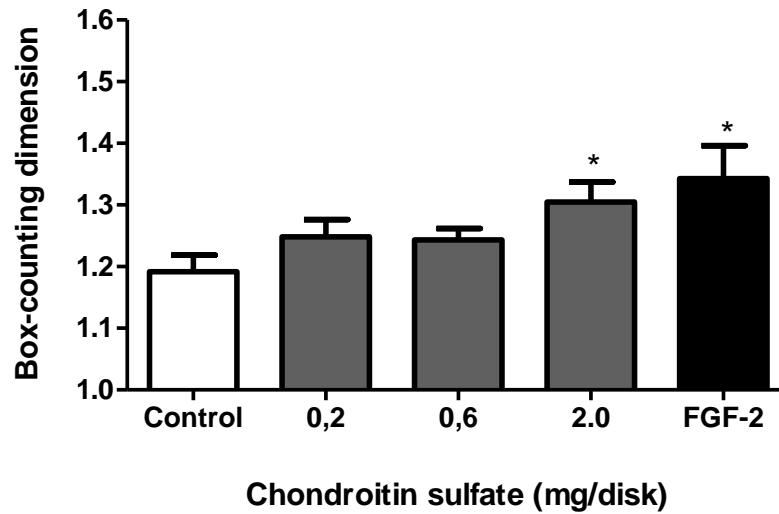


Figure 4. Stimulatory effect of chondroitin sulfate (0,2 - 2 mg/disk) on vascularization of the 8-day YSM. Results are quantified by box-counting fractal dimension (D_{BOX}). The controls were performed with vehicle (water, negative control) and FGF2 (50 ng/disk, positive control). Each bar represents the mean \pm SEM of six eggs. * $p < 0.05$, versus negative control (ANOVA and Tukey as a *post hoc* test).

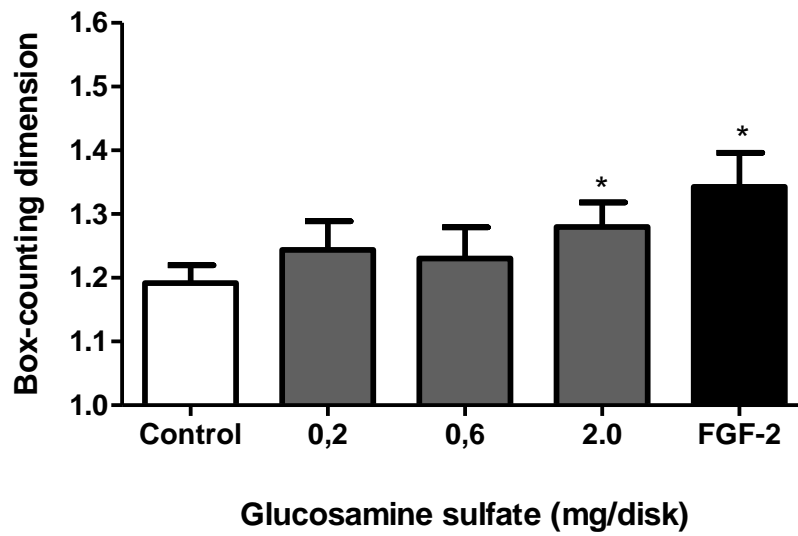


Figure 5. Stimulatory effect of glucosamine sulfate (0,2 - 2 mg/disk) on vascularization of the 8-day YSM. Results are quantified by box-counting fractal dimension (D_{BOX}). The controls were performed with vehicle (water, negative control) and FGF2 (50 ng/disk, positive control). Each bar represents the mean \pm SEM of six eggs. * $p < 0.05$, versus negative control (ANOVA and Tukey as a *post hoc* test).

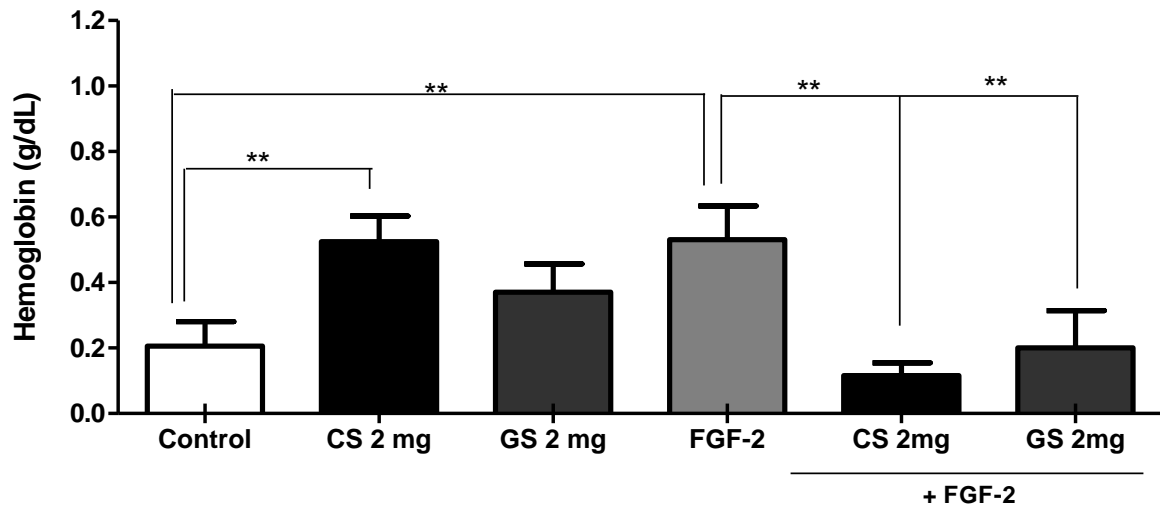


Figure 6. Effects of CS and GS (2 mg/animal), as well as combined with FGF2 (50 ng/animal) in subcutaneously implanted gelfoam plugs in adult mice (*M. musculus*), based on hemoglobin content in the plug (570 nm). The test implants were adsorbed from 50 μ L of FGF2 (50 ng), with or without CS or GS. The negative and positive controls consisted of, respectively, 50 μ L PBS (vehicle) and FGF2 (50 ng). Each column and vertical bar represents the mean and SEM for at least 5 animals, and the asterisks denote statistically significant differences for $**P<0.01$.

GUIDE FOR AUTHORS (Guia para submissão)

MICROVASCULAR RESEARCH

Microvascular Research is an international journal dedicated to the dissemination of fundamental information related to the microvascular field.

Types of paper

Research article

Brief (Short) Communications. Preliminary reports will be reviewed for prompt publication; however, the comments must be restricted to no more than six typewritten pages, including references, tables, and illustrations.

Technical Reports. Please contact the Editors-In-Chief through mvr@elsevier.com before submission.

Letters to the Editor. Letters to the Editor may consist of either of two types of correspondence: (1) a question or challenge to an article published recently in the journal or (2) a brief communication describing a preliminary research report or a review. Letters to the Editor should be limited to no more than three double-spaced typewritten pages and a maximum of five references.

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it

is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts

Before the accepted manuscript is published in an online issue

Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include:

The reason the name should be added or removed or the author names rearranged.

Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that:

Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests.

Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take

advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/mvr/>. If you are unable to provide an electronic version of your paper, please contact the Editorial Office prior to submission (e-mail: mvr@elsevier.com; telephone: +1-619-699.6354; fax: +1-619-699.6211).

Referees

To facilitate the publication of manuscripts, especially those papers based upon a new, theoretical concept, the Editors invite each contributor to submit the names of at least three scientists who could review the submitted manuscript.

Additional information US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Title

The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

There should be no subtitles.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full

postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: Database ID: xxxx
wledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and

personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;
List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;
CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

1 vol

PAG: 1

PRODUTO: 160-GLUCOSAMINA SULFATO
LOTE FABRICANTE: 20090928
FABRICANTE: ZHEJIANG AOXING
PAIS DE ORIGEM: CHINA
PROCEDENCIA: CHINA
CLIENTE: AD OCEANUM INDUSTRIA E COMER
FORMULA MOLECULAR: 2(C6H13NO2) H2SO4
PESO MOLECULAR: 605.3
CATEGORIA TERAPEUTICA: ANTI-REUMATICO
C.A.S.: 38899-05-7
D.C.B.: N/A
D.C.I.: N/A

LOTE_INTERNO: 032939

FABRICACAO...: 09/2009 N.FISC: 11384
VALIDADE....: 09/2012 QTD: 25,000

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Aspecto	Po cristalino	De acordo
Cor	Branco	De acordo
Rotacao Especifica	+50° a +52°	51.24
Conteudo	98.0 a 102.0%	99,32
Perda por secagem	Max.1.0%	0.03
Residuo de ignicao	27.0 a 29.0%	27,63
pH (sol aquosa)	3.0 a 5.0 (20mg/ml)	4.29
Metais Pesados	Max.10ppm	<10
C. Total de Placas	Max.1000cfu/g	100
Bolores e Leveduras	Max.100cfu/g	30
Salmonella	Ausente	De acordo
Sulfato	15.5 a 16.5%	16.0
Sodio	Passa teste	De acordo
Arsenio	Max. 0,5ppm	De acordo
Solvente residual	Passa teste	De acordo
Identificacao	IR:conforme padrao A	De acordo
Testes	Cloreto, sulfato e potassio B	De acordo
Tempo de retencao	Passa teste C	De acordo
Odor	Inodoro	De acordo
Densidade	Min. 0.85 g/ml	0.88
Densidade compactada	Passa teste	De acordo
Tamanho da particula	100% mesh 30	De acordo
Transmitancia	Min. 90.0%(sol 10% em agua a 450nm)	96.7
Cloreto	11.7 a 12.3 %	11.8
Potassio	11.7 a 13.0 %	11.9
Ferro	Max. 10 ppm	De acordo

Karina Pontes Martinho

Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263

Renata Cézar

Farmacêutica Responsável pelo
Controle de Qualidade CRF-SP: 34.899

As assinaturas são válidas somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.

É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nossa farmacêutica do Controle de Qualidade pelo Telefone: (11) 2067-5713



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

PAG.: 2

PRODUTO: 160-GLUCOSAMINA SULFATO
LOTE FABRICANTE: 20090928
FABRICANTE: ZHEJIANG AOXING
PAIS DE ORIGEM: CHINA
PROCEDENCIA: CHINA
CLIENTE: AD OCEANUM INDUSTRIA E COMER

LOTE_INTERNO: 032939

FABRICACAO...: 09/2009 N.FISC: 11384
VALIDADE....: 09/2012 QTD: 25,000

Chumbo	Max. 0.5 ppm	0.14
Mercurio	Max. 0.5 ppm	0.06
Impurezas org. volateis	Passa teste	De acordo
E. coli	Ausente em 1g	De acordo
S. aureus	Ausente em 10 g	De acordo
Enterobactérias	Max. 100UFC/g	<30
Outros micro. gran neg.	Max. 100 UFC/g	<30

REF.BIBLIOGRAFICA:O PRODUTO SEGUE METODOLOGIA USP 31

- (*)
- (*) Os ensaios assinalados foram realizados em Laboratorio Terceirizado.

ARMAZENAMENTO:MANTER HERMET. FECHADO / AO ABRIGO DA LUZ
ADV.SEGURANCA:NAO SE APLICA
CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL !
SE HOVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO.TECNICO.


Karina Pontes Martinho
Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263


Renata Cézar
Farmacêutica Responsável pelo
Controle de Qualidade CRF-SP: 34.899

As assinaturas são válidas somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.

É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nossa farmacêutica do Controle de Qualidade pelo Telefone: (11) 2067-5713

CONDROITINA SULFATO SODICA USP

C.A.S.: 9082-07-9

Seq.1/2 Página: 1/2

916

Data de Fabricação: 1/11/2009

Lote de Fabricação: 091126

Produto encontra-se nos seguintes volumes

Data de Validade: 28/11/2011

País de Origem: CHINA

2

Lote Galena (CIQ): 1006007004

Nota Fiscal: 0076916

Ordem Fracionamento (OF): 321972

Dados do Requisitante

Requisitante: GALENA QUIMICA E FARMACEUTICA LTDA.

CNPJ: 57.442.774/0001-90

Endereço: RUA PEDRO STANCATO, 860 - CAMPO AMARAIS

Cidade: CAMPINAS/SP

CEP: 13.082-050

Peso Molecular: 499.38

ARMAZENAMENTO: Armaz.Temp. Ambiente, em recipiente fechado protegido da luz e umidade.

Análises/Componentes	Especificações	Incerteza de Medição (U)	Resultados das análises
PROPRIEDADES FISICO-QUIMICAS			
• Descrição (0)	Pó fino branco a creme, fluidez livre.		Pó fino creme, fluidez livre.
• Doseamento * (0)	90,0% a 105,0% (calculado em relação a base seca)	1,4 %	90,4 %
• pH (0)	5,5 a 7,5	0,1	6,9
• Perda por dessecação (105°C, 4 hs) (0)	Não mais que 10,0%	0	8,5 %
• Metais pesados (método II) (0)	Não mais que 20ppm		< 20 ppm
• Resíduo de ignição (0)	Entre 20,0% e 30,0%	0,1 %	25,2 %
• Cloreto (0)	Não mais que 0,50%		< 0,50 %
• Rotação Específica * (0)	Entre - 20,0° à - 30,0°		-24,0 °
• Sulfato * (0)	Não mais que 0,24%		Conforme
• Solvente residual * (0)	Conforme		Conforme
• Impurezas org. voláteis (método I) * (0)	Conforme		Conforme
• Claridade e cor da solução (0)	Conforme		Conforme
• Limite de Proteína * (0)	Não mais que 6,0%		3,1 %
• Pureza eletroforética (0)	Não mais que 2%		Conforme
IDENTIFICAÇÃO			
• Infravermelho (0)	Positivo		Positivo
• Sódio (0)	Positivo		Positivo
MICROBIOLÓGICO			
• Fungos e leveduras (0)	Não mais que 100ufc/g	35	< 10 ufc/g
• Salmonella spp (0)	Ausente		Ausente
• Escherichia coli (0)	Ausente		Ausente
• Contagem total (0)	Não mais que 1000ufc/g	80	1,0 x 10 ufc/g

OBSERVAÇÕES

- Os resultados presentes neste Certificado de Análise, tem seus valores restritos a este lote.

* - Análises em acordo com o certificado de análise do fabricante.

- As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.

Referências: (0) Farmacopéia Americana, 31° Edição..

- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência $k = 2$, que para uma distribuição normal corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%. A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.

Galena Química e Farmacêutica Ltda.

Rua Pedro Stancato, 860
Campinas - SP - Brasil
CEP 13082.050
Tel | Fax +55 19 3746.7700

www.galena.com.br

CONDROITINA SULFATO SODICA USP

C.A.S.: 9082-07-9

Seq.1/2 Página: 2/2 (Continuação...) **916**

Resultado: (**X**) **Aprovado**

Dt.Início: 30/03/2010 Dt.Término: 31/03/2010



Lúcia Eli Scareli
Responsável Técnica
CRF-SP: 16148



Andrea Molon
Sup. Controle de Qualidade