

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PUEBLA CASSINI VIEIRA

Ensaio pré-clínico da desintegrina recombinante DisBa-01 na angiogênese
inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos

UBERLÂNDIA

2014

PUEBLA CASSINI VIEIRA

Ensaio pré-clínico da desintegrina recombinante DisBa-01 na angiogênese
inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dr^a. Fernanda de Assis Araújo

Co-orientador: Dr^a. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

UBERLÂNDIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

V658e Vieira, Puebla Cassini, 1989-
2014 Ensaio pré-clínico da desintegrina recombinante DisBa-01 na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos /
Puebla Cassini Vieira. -- 2014.
70 f : il.

Orientador: Fernanda de Assis Araújo.

Coorientador: Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Neovascularização - Teses. 3. Inflamação - Teses.
I. Araújo, Fernanda de Assis. II. Araújo, Heloisa Sobreiro Selistre de. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico, Número 020/2014 do PPGBC

Data: 11 de Março de 2014

Discente: Puebla Cassini Vieira Matrícula nº. 11212BCE011

Título do Trabalho: “Ensaio pré-clínico de uma desintegrina recombinante (DisBa-01) na angiogênese inflamatória induzida por implantes”.

Às nove horas do dia onze de março de 2014 no bloco 2A, no Laboratório de Prática Virtuais - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professoras Doutoras: Sílvia Passos Andrade/UFGM; Luciola da Silva Barcelos/UFGM e Fernanda de Assis Araújo/UFU orientadora do candidato. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato Puebla Cassini Vieira, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Puebla Cassini Vieira aprovado

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 12:20h. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Sílvia Passos Andrade

Profa. Dra Sílvia Passos Andrade
UFMG

Luciola da S. Barcelos

Profa. Dra Luciola da Silva Barcelos
UFMG

Araújo

Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo
UFU

Dedico este trabalho à professora Fernanda e
para minha mãe, Mara. Esse trabalho é nosso!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às pessoas que me ajudaram e apoiaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho. E como trabalho! Mas quer saber? Eu sou o aluno mais sortudo! Sem vocês tudo isso não teria graça!

- À professora, orientadora, amiga, Fernanda. Primeiramente, pela oportunidade de continuar meus estudos. Você me aceitou como aluno, sabendo que eu, sequer, conhecia uma pipeta rsrss. Teve paciência (e ainda tem!) com meu processo de desenvolvimento, sempre atenciosa com a incrível tarefa de tentar desenrolar meus pensamentos! Você é um exemplo para mim! Nunca perca o carinho e espontaneidade com que lida com as pessoas, precisamos de mais Fernandas no mundo rsrsrs. Você não ganhou só um aluno, ganhou um amigo e um admirador!
- À Dr^a. Heloisa Selistre de Araújo, pela prontidão e disponibilidade em responder meus e-mails, por ter proporcionado meu estágio na UFSCAR e pela atenção dispensada no Congresso Internacional de Toxinologia. Ver nossos resultados sendo apresentados aos grandes cientistas da área foi sensacional!
- Às professoras Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos e Dr^a. Silvia Passos Andrade, por terem gentilmente aberto as portas dos seus laboratórios para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. Fico muito feliz de ficar próximo de pessoas tão especiais! É uma honra! Espero poder compartilhar ainda muitos momentos!
- Às professoras Dr^a. Daniele Ribeiro e Dr^a. Renata Zanon, obrigado pela “ajuda aos universitários” rsrs, que com toda paciência auxilia a todos os alunos da pós-graduação!
- À professora Dr^a. Tatiana Tomiosso, que me fez apaixonar pela Biologia Celular e pela matriz extracelular. Obrigado, mesmo! Estou levando muito a sério os meus estudos com meus livros rrsrs

- Ao Professor Drº. Paulo Rogerio pela paixão com que coordena o programa de pósgraduação! Sua dedicação é admirável!
- Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, pelo profissionalismo, eficiência e amizade com que sempre me auxiliaram;
- À todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Histologia, que sempre me auxiliaram e se mostraram grandes amigos;
- Ao Instituto Valleé (Uberlândia) e Pentapharm (Uberlândia) pela aquisição dos animais;
- Ao Sr. Rubens, Srª. Neuza e Mônica (família da Simone) por gentilmente me hospedarem em suas casas;
- Aos amigos que fiz na UFSCAR e aos meus amigos e futuros colegas de trabalho da UFMG, sem vocês esse trabalho não se concretizaria;
- Aos DEMÔNIOS de coração Lígia, Amanda, Simone, Juliele, Dininha, Aline, Luís, Alex, Thais, Pedro, Saulo e Anderson. Obrigado pelas risadas, companhia, pelas cervejas, cafés, pelas noitadas, pelas fofocas, pelos “causos”, enfim! Não dá pra descrever a importância de vocês!
- À Cassinada, sempre presente, participando dos momentos que estou vivenciando. Vocês são especiais e tenho certeza que é a MELHOR FAMÍLIA DO MUNDO!
- Aos meus grandes companheiros(as) nesta batalha Rodolfo, Mara, Mauro, Gabriela, Pietro, Priscilla, Tia marcia, Titita e Baia pela paciência em ouvir meus devaneios e abstrair minhas loucuras! Amo vocês!

OBRIGADO !

RESUMO

A angiogênese e a inflamação atuam simultaneamente em diversos processos fisiopatológicos. A angiogênese inflamatória é dependente de uma série de interações com a matriz extracelular (MEC) que são mediadas principalmente por receptores integrinas. Assim, peptídeos que possam atuar sobre as integrinas vêm sendo amplamente estudados. Alguns peptídeos como as desintegrinas funcionam como antagonistas das integrinas. As desintegrinas compreendem uma família de polipeptídeo não enzimáticos, de baixo peso molecular, derivados a partir da peçonha de serpentes, que inibem fortemente as funções das integrinas. Neste estudo avaliou-se o efeito terapêutico da desintegrina DisBa-01, derivada da peçonha da serpente *Rhinocerophis alternatus* na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos. Este modelo experimental consiste na implantação de uma matriz sintética no tecido subcutâneo do animal, que induz a formação de tecido fibrovascular rico em células inflamatórias, vasos sanguíneos e MEC. O modelo de implantes sintéticos, também permite a avaliação concomitante da inflamação, angiogênese e do reparo tecidual. O tratamento intra-implante com diferentes doses de DisBa-01 inibiu os principais componentes inflamatórios e angiogênicos do tecido fibrovascular. Os efeitos anti-inflamatórios da DisBa-01 foram observados por reduções na atividade de MPO (representando neutrófilos ativados), NAG (representando macrófagos ativados), nas quimiocinas CXCL-1, MCP-1 e pela citocina TNF- α . A atividade anti-angiogênica foi observada através da redução do conteúdo de hemoglobina, do número de vasos em cortes histológicos, bem como por uma redução no fluxo sanguíneo intra-implante através da imagem de perfusão por laser doppler e dos níveis das citocinas pró-angiogênicas VEGF e FGF. No entanto, o tratamento não foi capaz de produzir efeitos significativos sobre os principais componentes do reparo tecidual, como o colágeno e a citocina TGF- β . A avaliação de DisBa-01 nos múltiplos parâmetros reveladas neste estudo demonstrou evidências adicionais ao potencial terapêutico desta desintegrina.

Palavras chave: Angiogênese, inflamação, desintegrinas, integrinas.

ABSTRACT

Angiogenesis and inflammation act simultaneously in several pathophysiological processes. The interactions with the extracellular matrix (ECM) are required in inflammatory angiogenesis. The non-enzymatic disintegrins comprise a family of peptides, low molecular weight, derived from the venom of snakes, which strongly inhibit the functions of integrins. In this study we evaluated the therapeutic effect of disintegrin DisBa-01, derived from the venom of the snake *Rhinocerophis alternatus* in inflammatory angiogenesis induced by synthetic implants in mice. Treatment with DisBa-01 inhibited the main key components of fibrovascular tissue induced by implants as inflammation and angiogenesis, without changing the fibrogenic component. This experimental model is the implementation of a synthetic matrix in the subcutaneous tissue of the animal, which induces the formation of fibrovascular tissue rich in inflammatory cells, blood vessels and MEC. The model of synthetic implants, also allows the simultaneous evaluation of inflammation, angiogenesis and tissue repair. The inhibitory effects of DisBa-01 were observed by MPO activity (representing activated neutrophils), NAG activity (representing activated macrophage), the chemokines CXCL -1, MCP-1 and the cytokine TNF- α . The anti-angiogenic activity was observed through the reduction of hemoglobin content, number of vessels, blood flow intra-implant by laser doppler and the levels of VEGF and FGF cytokines. The evaluation of DisBa-01 in multiple parameters provides additional evidence to the therapeutic potential of this disintegrin.

Keywords: Angiogenesis, inflammation, disintegrin, integrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Modelo de múltiplos passos do recrutamento de leucócitos.....	15
FIGURA 2	Interação celular durante a resolução da inflamação.....	16
FIGURA 3	Diagrama esquemático ilustrando a associação entre inflamação crônica e angiogênese.....	18
FIGURA 4	Ativadores e inibidores da angiogênese.....	19
FIGURA 5	Etapas adesivas em angiogênese.....	21
FIGURA 6	A expressão diferencial de integrinas durante a angiogênese.....	22
FIGURA 7	Matriz extracelular.....	23
FIGURA 8	Representação esquemática da família das integrinas.....	24
FIGURA 9	Sinalização bidirecional da integrina.....	25
FIGURA 11	Serpente com seus dentes inoculadores.....	27
FIGURA 12	Compostos encontrados na peçonha da serpente.....	28
FIGURA 13	Desintegrinas e seus efeitos biológicos.....	29
FIGURA 14	Representação esquemática de DisBa-01 por cristalografia.....	30
FIGURA 15	<i>Rhinocerophis alternatus</i>	31
FIGURA 16	Modelo de implantes sintéticos (1987).....	32
FIGURA 17	Modelo de implantes sintéticos (atual).....	32
FIGURA 18	Exemplo de análise por <i>Laser Doppler</i>	40
GRÁFICO 1	Efeito do tratamento com DisBa-01 sobre o peso dos implantes.....	43
GRÁFICO 2	Efeito do tratamento com DisBa-01 na atividade de mieloperoxidase.....	43
GRÁFICO 3	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de CXCL-1/KC.....	43
GRÁFICO 4	Efeito do tratamento com DisBa-01 na atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase	44

GRAFICO 5	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de CCL/JE/MCP-1.....	44
GRÁFICO 6	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de TNF- α	45
GRÁFICO 7	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de hemoglobina.....	47
FIGURA 17	Cortes histológicos do tecido fibrovascular (corados com HE).....	47
GRÁFICO 8	Quantificação de do número de vasos sanguíneos.....	48
GRÁFICO 9	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de VEGF.....	48
GRÁFICO 10	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de FGF.....	49
GRÁFICO 11	Avaliação do fluxo sanguíneo dos implantes através de imagens por <i>Laser Doppler</i>	50
QUADRO 1	Valores estatísticos da avaliação do fluxo sanguíneo nos implantes sintéticos através de imagem por Laser Doppler.....	50
GRÁFICO 12	Efeito do tratamento com DisBa-01 na deposição de colágeno.....	51
GRÁFICO 13	Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de TGF- β 1.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soro albumina bovino
CCL2/JE/MCP-1	Quimiocina CC ligante 2/ Proteína quimiotática para o monócito -1 (MCP-1)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CXC	Grupo de quimiocinas com uma cisteína entre os dois resíduos amino-terminais
CXCL-1/KC	Quimiocina motivo CXC ligante 1 / Quimiocina derivada de queratinócito
dH₂O	Água destilada
DisBa-01	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
DMEM	Meio Dulbecco Mem
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked ImmunoSobrent Assay</i>
EPM	Erro padrão da media
FAK	Quinase de adesão focal (Focal adhesion kinase)
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
g	Gramas
H₂O₂	Peroxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
Hb	Hemoglobina
H.E.	Hematoxilina e Eosina
HTAB	Hexadecil trimetil brometo de amônio
HUVEC	Célula do endoteliais humanas de cordão umbilical
ICAM	Membro da superfamília das imunoglobulinas
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular

Mili-Q H₂O Água ultra pura

mL	Militros
 mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetyl-β-D-glicosaminidase
NaPO₄	Fosfato de sódio
nM	NanoMolar
nm	NanoMetro
O.D	Densidade óptica
r.p.m	Rotações por minuto
SVMP	Metaloproteinases derivadas do veneno das serpentes
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
µg	Microgramas
µm	Micrometros
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Inflamação.....	14
1.2 Angiogênese.....	19
1.3 Matriz extracelular e Integrinas.....	22
1.4 Peçonha de serpentes, desintegrinas e DisBa-01.....	27
1.5 Modelo experimental de implantes de sintéticos.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Efeitos do tratamento de DisBa-01 na inflamação.....	42
4.2 Efeitos do tratamento de DisBa-01 na angiogênese.....	46
4.3 Efeitos do tratamento de DisBa-01 na deposição de colágeno.....	51
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A – Aceitação e publicação do artigo na revista Toxicon.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta imunitária essencial na manutenção da homeostase tecidual sob uma variedade de condições nocivas ao tecido, como ocorre durante as infecções ou lesões no tecido, permitindo assim a sobrevivência do organismo. O processo inflamatório, também é essencial em condições fisiológicas como, por exemplo, na cicatrização de feridas (MEDZHITOY, 2010). Embora a inflamação seja um processo fisiológico, auxiliando na remoção dos estímulos nocivos, restos celulares e inicie o reparo tecidual; a reação inflamatória, em alguns casos, quando exacerbada pode causar danos consideráveis aos tecidos (LIU et al., 2014).

O processo inflamatório pode ser induzido por uma série de mediadores químicos produzidos por células residentes no tecido, como macrófagos e mastócitos, em resposta a diferentes estímulos como ocorre nas infecções, cicatrização de feridas, traumas, reações imunológicas, necrose tecidual ou corpos estranhos. Assim, independente do estímulo inicial, a agressão tecidual induz de imediatos à secreção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios no local, como a histamina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina -1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Esses mediadores químicos podem atuar sobre vários componentes teciduais, um dos principais efeitos desses mediadores inflamatórios é a indução da expressão de moléculas adesivas como selectinas e integrinas tanto no endotélio da microcirculação local, quanto em leucócitos circulantes (MEDZHITOY, 2008). Essas moléculas adesivas medeiam a interação entre leucócitos e endotélio, permitindo que leucócitos ao final do processo possam transmigrar da circulação sanguínea para o tecido inflamado (LEY et al., 2007) (Figura 1).

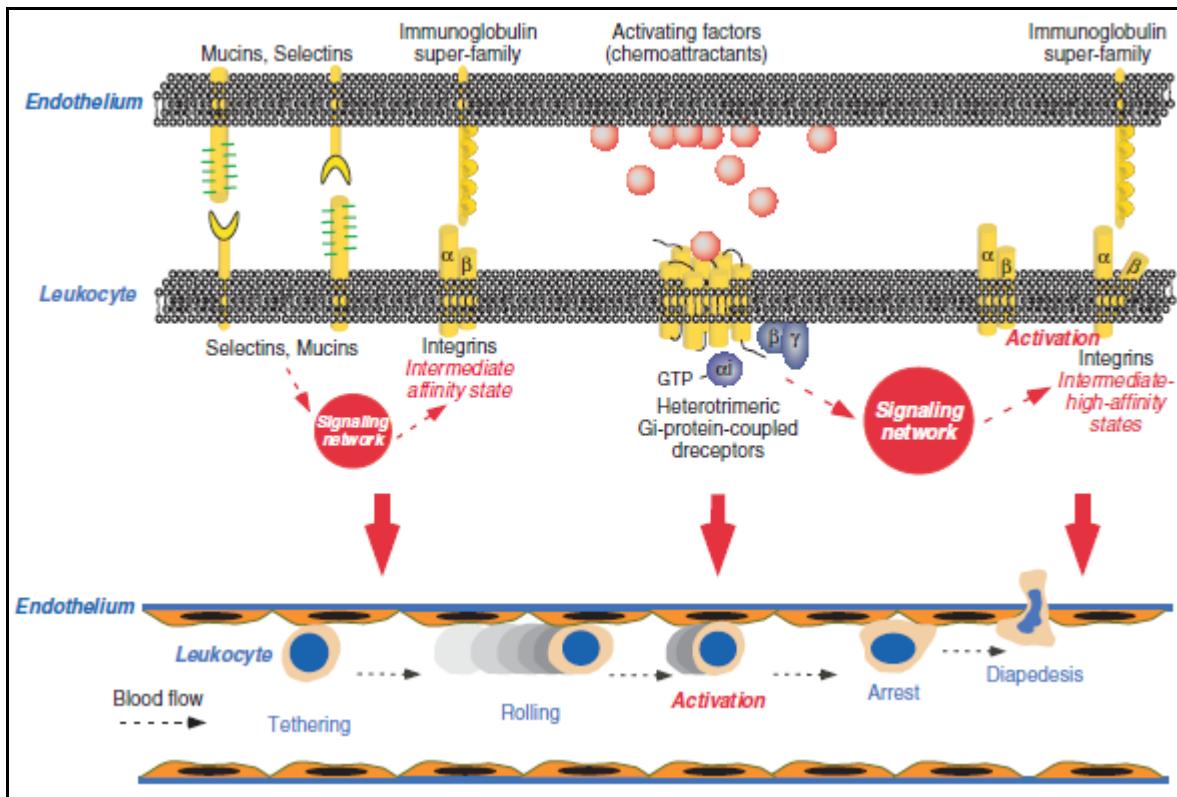


Figura 1: Modelo de múltiplos passos do recrutamento de leucócitos - Sequência de eventos celulares (parte inferior) e o mecanismo molecular (parte superior) que controlam o recrutamento de leucócitos na inflamação. Na figura estão representadas as interações moleculares entre diversas moléculas de adesão celular (selectinas, muscinas, integrinas e superfamília de imunoglobulinas do tipo 1), quiomiocinas, receptores de superfície celular e a ativação de vias de sinalização durante o processo. As setas vermelhas indicam os eventos celulares em que os mecanismos moleculares correspondentes estão envolvidos. Figura reproduzida de: LAUDANNA, C; VITTORI, MB. Integrin activation in the immune system. *Wire Systems Biology and Medicine*, p.117, 2009.

No tecido inflamado, uma série de mediadores químicos, como a quiomiocina CXCL-1 (quiomiocina motivo CXC ligante 1) estimulam, principalmente, o recrutamento de neutrófilos para o local. Os neutrófilos ao serem ativados, secretam o conteúdo de seus grânulos, contendo principalmente, a enzima mieloperoxidase (MPO), que auxilia na destruição de patógenos (BURG et al., 2001).

Os monócitos circulantes também são recrutados por fatores quimiotáxicos tais como CCL-2/JE/MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) e após transmigrarem para o tecido, diferenciam-se em macrófagos. (HASKÓ et al., 2012). De acordo com seu fenótipo, os macrófagos podem ser classificados em dois grupos funcionais: Os macrófagos M1 ou também chamados de macrófagos pró-inflamatório, que possuem propriedades pró-inflamatórias, com capacidade de mediar respostas de defesa contra uma variedade de microorganismos e os macrófagos M2 ou também chamado de macrófago reparador que

possui um importante papel na síntese de mediadores anti-inflamatórios/pró-resolutivos essenciais no processo de reparo tecidual (ALBER et al., 2012).

Quando o estímulo inicial da inflamação é cessado, ocorre a resolução da inflamação. Nesta fase os neutrófilos entram em apoptose após realizarem sua ação no local. Em seguida, os macrófagos M1 promovem a fagocitose de neutrófilos apoptóticos (eferocitose), promovendo uma alteração no fenótipo do macrófago com perfil M1 para macrófago com perfil M2 (Figura 2). Os macrófagos M2 secretam grandes quantidades de mediadores anti-inflamatórios/pró-resolutivos. Assim, na medida em que os mediadores anti-inflamatórios sobrepõem aos mediadores pró-inflamatórios, isso favorece o processo de reparo tecidual e consequentemente o retorno da homeostase tecidual (ORTEGA-GOMEZ et al., 2013).

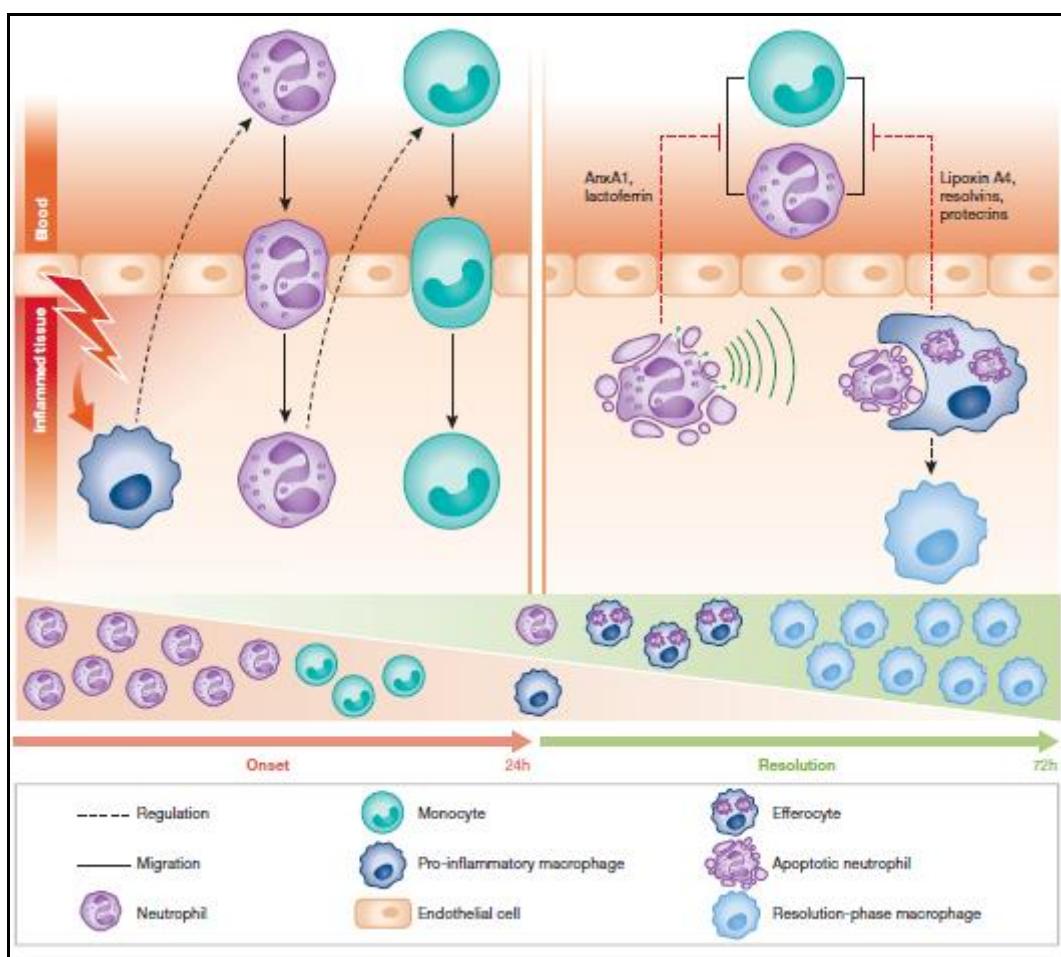


Figura 2: Interações celulares durante a resolução da inflamação - Visão geral dos processos celulares durante o inicio/inflamação aguda (esquerda) e resolução (à direita) da inflamação. Durante fases iniciais, as células residentes do tecido percebem danos e liberam sinais que induzem uma rápida emigração de neutrófilos e uma emigração lenta de monócitos. O processo de resolução é iniciado quando ocorre a apoptose dos neutrófilos e um aumento de mediadores pró-resolutivos no local. A eferocitose dos neutrófilos apoptóticos por macrófagos altera o fenótipo de macrófagos M1 para macrófagos M2, promovendo o retorno à homeostase tecidual. ORTEGA-GOMEZ et al. Resolution of inflammation. EMBO Molecular Medicine, p. 664, 2013.

O processo de remodelamento tecidual é regulado por diversos mediadores químicos e coordenado por interações das células com elementos da matriz extracelular, como o colágeno. O remodelamento acontece simultaneamente ao processo de resolução da resposta inflamatória, na qual macrófagos M2 secretam grandes quantidades de citocinas envolvidas com o processo de resolução, formação do tecido granulação e fibrogênese, tais como o fator de crescimento transformador β (TGF- β) que, estimula a deposição de colágeno, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (LIU et al., 2013).

Em alguns casos, quando o agente causador da lesão inicial persiste ou ocorre uma falha na regulação do processo de resolução da resposta inflamatória, o processo inflamatório torna-se crônico. A inflamação crônica é uma resposta inflamatória com duração prolongada (semanas, meses ou anos), sendo caracterizada, principalmente, pela permanência de neutrófilos no sítio inflamatório, o qual secretam continuamente substâncias nocivas, que promovem a destruição tecidual, além da estimulação continua da deposição de colágeno (fibrose) e a formação de novos vasos sanguíneos através de um mecanismo denominado angiogênese (SZEKANEZ, 2004).

O termo angiogênese é comumente usado para fazer referência a um conjunto integrado de processos bioquímicos, celulares e moleculares pelos quais novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes (FOLKMAN, 2007). Embora a angiogênese seja um evento fisiológico no contexto da inflamação, pois objetiva melhorar o aporte de oxigênio e nutrientes ao tecido lesado, também promove um aumento do infiltrado inflamatório que, por sua vez produz mais citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas promovendo um ciclo vicioso e patológico entre inflamação e angiogênese (COSTA et al., 2007) (Figura 3). Essa associação patológica entre inflamação e angiogênese é à base de uma série de doenças crônicas tais como: psoríase, artrite reumatoide, desordens oculares e neoplasias. (VENDRAMINI-COSTA et al., 2012; VESTWEBER, 2007).

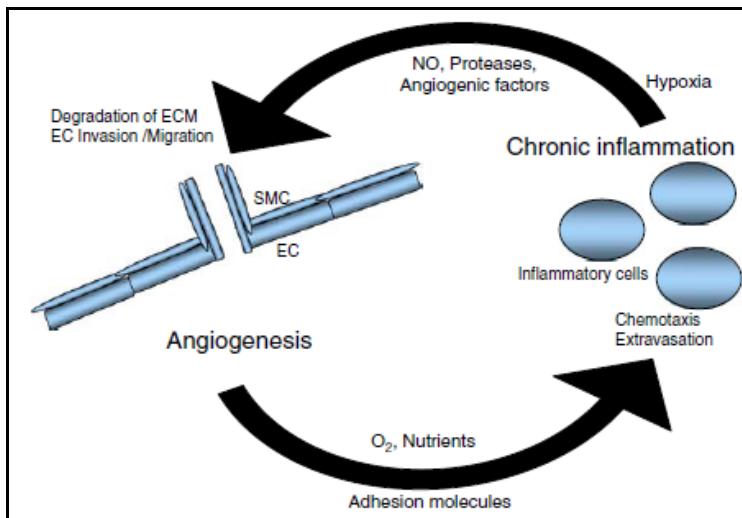


Figura 3: Diagrama esquemático ilustrando a associação entre a inflamação crônica e a angiogênese - As células inflamatórias secretam fatores de crescimento, proteases e citocinas que induzem a degradação da MEC, estimulando a angiogênese. A neovascularização fornece mais células e citocinas inflamatórias, formando um ciclo vicioso, na qual angiogênese sustenta inflamação e inflamação sustenta angiogênese. Figura extraída de: COSTA, C.; INACIO, J.; SOARES, R. *Angiogenesis and chronic inflammation: Cause or consequence?*. *Angiogenesis*, p.151, 2007.

1.2 Angiogênese

O processo angiogênico no adulto encontra-se parcialmente inibido, isso porque as células endoteliais que formam os vasos sanguíneos encontram-se em um relativo estado de quiescência. Entretanto, as células endoteliais mantêm elevada plasticidade para detectar e responder sinais pró-angiogênicos. Em situações fisiológicas, o processo angiogênico está ativo no desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e durante o ciclo reprodutivo feminino e em condições patológicas como crescimento tumoral, artrite reumatoide, retinopatia diabética e doenças inflamatórias crônicas (CARMELIET, 2005).

A angiogênese é altamente regulada pelo balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos (Figura 7), atuando sinergicamente para manter a funcionalidade dos vasos. Uma série de fatores endógenos, pró e anti-angiogênicos, já foram identificados. Dentre os principais fatores pró-angiogênicos estão: O VEGF, óxido nítrico (NO), integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, TGF- β , FGF, metaloproteinases de matriz (MMP) e CCL2/JE/MCP-1 e dentro dos fatores anti-angiogênicos estão: A trombospondina, angiotatina, endostatina, vasostatina e inibidores de metaloproteínases (TIMP) (MUNDEL et al., 2007) (Figura 4).

<u>Activators</u>	<u>Inhibitors</u>
VEGF-A,-B,-C,-D	VEGFR-1
PLGF	Ang2
Ang1, Tie2	PAI-1,-2
PDGF-BB	TIMP-1,-2,-3,-4
TGF- β 1	Angiotatina
TGF- β receptors	Endostatina
FGF, HGF, MCP-1	Vasostatina
Integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$	Tumstatin
VE-Cadherin	Arresten, Canstatin
PECAM (CD31)	Thrombospondin-1,-2
Ephrins	MMP Inhibitors
Plasminogen Activator	PF-4
MMPs	Prolactin
NOS, COX-2	IFN- α , $-\beta$, $-\gamma$; IP-10
G-CSF, GM-CSF	IL-4, IL-12, IL-18



Figura 4: Ativadores e inibidores da angiogênese - Mais de 20 estimuladores e inibidores endógenos da angiogênese são conhecidos. Figura extraída de: MUNDEL, TM.; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. Microvascular Research, p.86. 2007.

Assim, os fatores pró-angiogênicos podem estimular o crescimento de novos vasos por diferentes mecanismos, dentre eles a vasculogênese, que é o crescimento de novos vasos através do recrutamento de células progenitoras endotelial derivadas da medula óssea. Já na intussuscepção, ocorre uma divisão binária das células endoteliais que formam um vaso pré-existente e através de um mecanismo denominado angiogênese por brotamento, na qual um novo vaso sanguíneo é formado a partir da diferenciação de uma célula endotelial normal em *tip cell* (célula endotelial com capacidade invasiva e migratória), que lidera a formação do vaso (broto capilar) (CARMELIET, 2005). A angiogênese por brotamento é o mecanismo mais estudo e algumas etapas deste processo são conhecidas (Figura 5).

Inicialmente, na angiogênese por brotamento, uma célula endotelial é estimulada por sinais pró-angiogênicos como VEGF e se diferencia em *tip cell* adquirindo um fenótipo com capacidade invasiva e migratória. A *tip cell* projeta extensões citoplasmáticas (filópodes) em direção ao estímulo angiogênico, liderando a formação de um novo vaso sanguíneo. Em seguida, as *stalk cells* proliferam-se para apoiar o alongamento e preparam-se para estabelecer o lúmen do novo vaso. O processo repete-se até ocorrer uma diminuição dos sinais pró-angiogênicos e o aumento dos fatores anti-angiogênicos, de forma a restaurar equilíbrio entre os fatores reguladores da angiogênese (RIBATTI et al., 2012; CAMELIET, 2000).

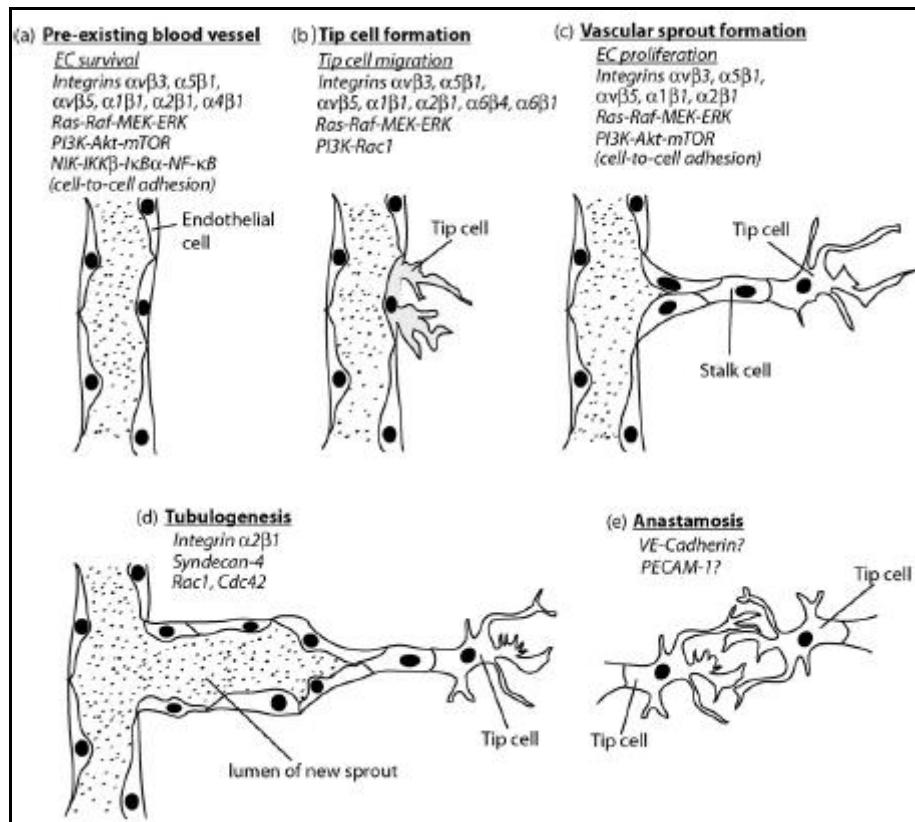


Figura 5: Etapas adesivas em angiogênese – (A) Um vaso sanguíneo com suas células endoteliais em estado de quiecência. (B) Uma célula endotelial é convertida em uma célula endotelial ativa, denominada tip cell. Esta célula emite filópodos que são orientados em direção ao estímulo angiogênico. (C) Células próximas a tip cell, as stalk cellssão altamente proliferativas. (D) Ao final do processo, vacúolos intracelulares das stalk cells se fundem formando o lúmen do vaso. (E) E a tip cell de um vaso recém-formado se anastomosa com a tip cell de outro vaso, formando uma rede vascular. Todos esses eventos são mediados por moléculas de adesão, como as integrinas. Figura extraída de: RAMJAUM, AR.; HODIVALA-DILKE, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, p.523, 2009.

Durante todas as etapas do processo angiogênico por brotamento são necessárias interações entre as células endoteliais com a MEC. As proteínas da MEC possuem sítios de ligação contendo a sequência arginina, glicina- ácido aspártico, esse sítio de ligação também é chamado de sítio RGD. Esses sítios são reconhecidos por receptores de adesão celular localizados na membrana plasmática da célula endotelial, como as integrina $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ e medeiam as interações entre células endoteliais e MEC. Essas interações entre células endoteliais e MEC mediadas pela integrina, além de permitir a ativação de vias de sinalização envolvidas na adesão e migração celular, também permite a ativação de vias relacionadas com a proliferação e sobrevivência da célula endotelial (RAMJAUN et al., 2009) (Figura 6).

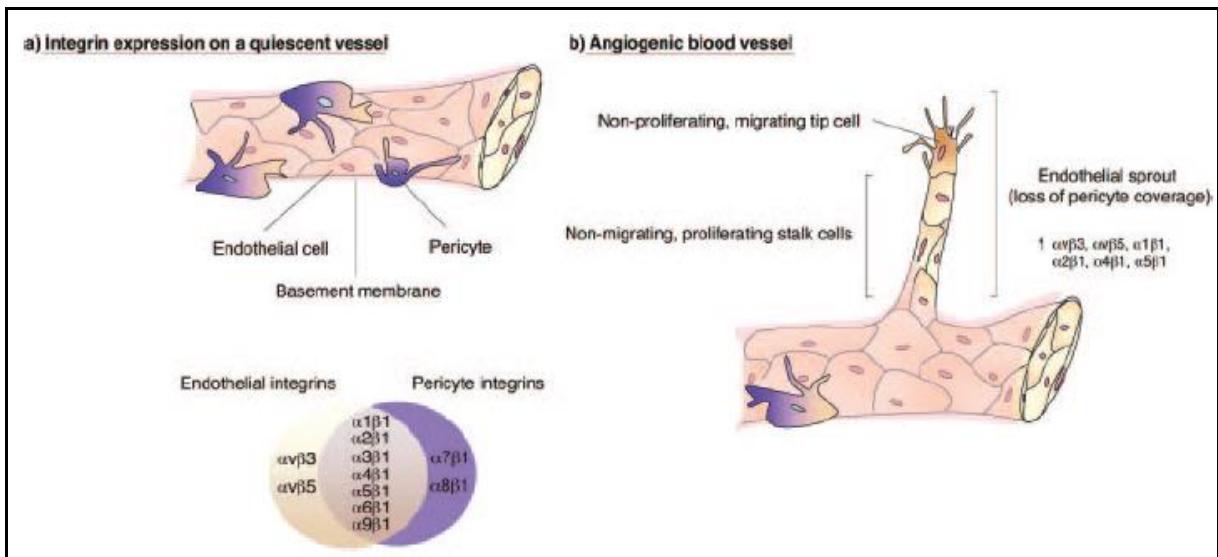


Figura 6: A expressão diferencial de integrinas durante a angiogênese. Durante a angiogênese ocorrem mudanças na expressão das integrinas. A expressão das integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ podem estar aumentadas durante angiogênese. Figura extraída de: SILVA, R. et al. Integrins: The keys to unlocking angiogenesis. Arterosclerosis, Trombosis and Vascular Biology, p.1704, 2008.

2.3 Matriz extracelular e integrinas

A matriz extracelular é composta por diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas (ex. fibronectina e laminina) que preenchem a maioria dos espaços intercelulares (COSTA et al., 2007) (Figura 10). A matriz extracelular está envolvida nas interações célula-célula, proliferação e migração celular, bem como na imobilização de moléculas e fatores solúveis, como citocinas e entre outros fatores de crescimento. Além disso, as interações das células com a MEC determinam o formato celular e regulam várias funções celulares, como a proliferação e sobrevivência celular (BOUVARD et al., 2013).

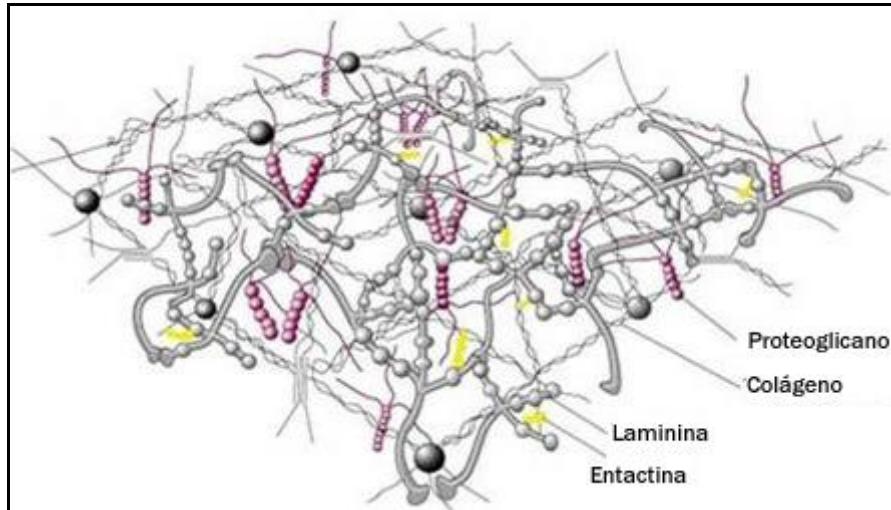


Figura 7: Matriz extracelular – A MEC é formada por glicoproteínas, diferentes tipos de colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos. Essas moléculas são secretadas por diferentes tipos de células e se organizam no meio extracelular por meio de múltiplas interações mediadas por receptores de adesão celular. Figura extraída de: <http://bionetic.com.br/tecido-conjuntivo>. Acessado em: 10/02/2014.

As relações complexas entre as células e os componentes da MEC são mediadas, principalmente, por receptores de adesão celular, localizados na membrana das células, denominados integrinas. As integrinas são proteínas transmembrana, heterodiméricas, constituídas por uma subunidade α e uma subunidade β , ligadas não covalentemente. Em vertebrados, são conhecidas 18 subunidades α e 8 subunidades β o que perfaz 24 tipos diferentes de receptores conhecidos (Figura 8), com estrutura similar, mas com afinidades diferentes pelos componentes da MEC (BOUVARD et al., 2013; TAKADA et al., 2007).

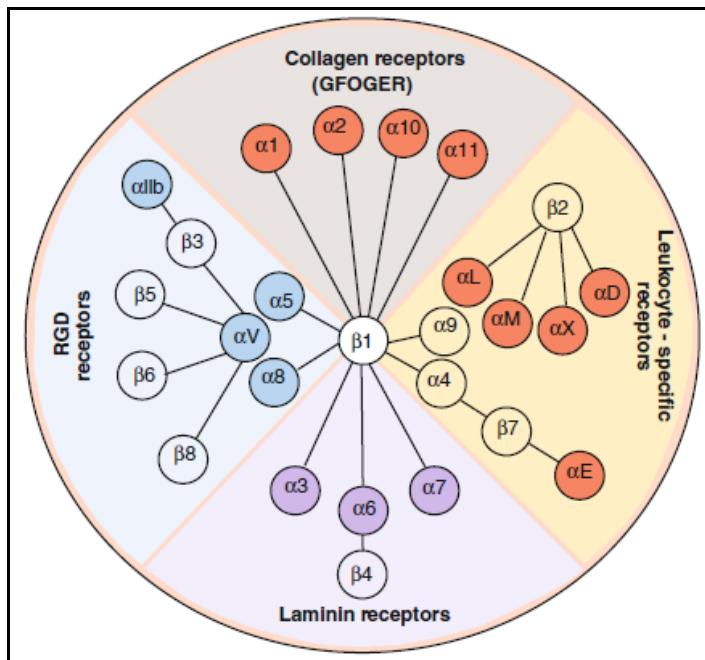


Figura 8: Representação esquemática da família das integrinas. Nos vertebrados a família das integrinas contém 24 tipos de receptores diferentes. Figura extraída de: BAREZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG.D. Integrins. Cell Tissue Research, p.272, 2010.

O domínio extracelular destas moléculas transmembranas se liga aos componentes da MEC ou a outras integrinas, enquanto o domínio intracelular estabelece ligações com proteínas intracelulares como a talina, vinculina e α -actinina, promovendo assim, uma organização do citoesqueleto, bem como a modulação de diferentes funções como sobrevivência e diferenciação celular (Figura 9). Quando a sinalização da integrina é ativada por outras integrinas ou por componentes da MEC, é denominada “sinalização de fora para dentro”. Por outro lado, a “sinalização de dentro para fora”, é quando a ativação da integrina é desencadeada em resposta a sinais intracelulares como, por exemplo, os sinais desencadeados em resposta aos fatores de crescimento e quimiocinas (SILVA et al., 2007) (Figura 10).

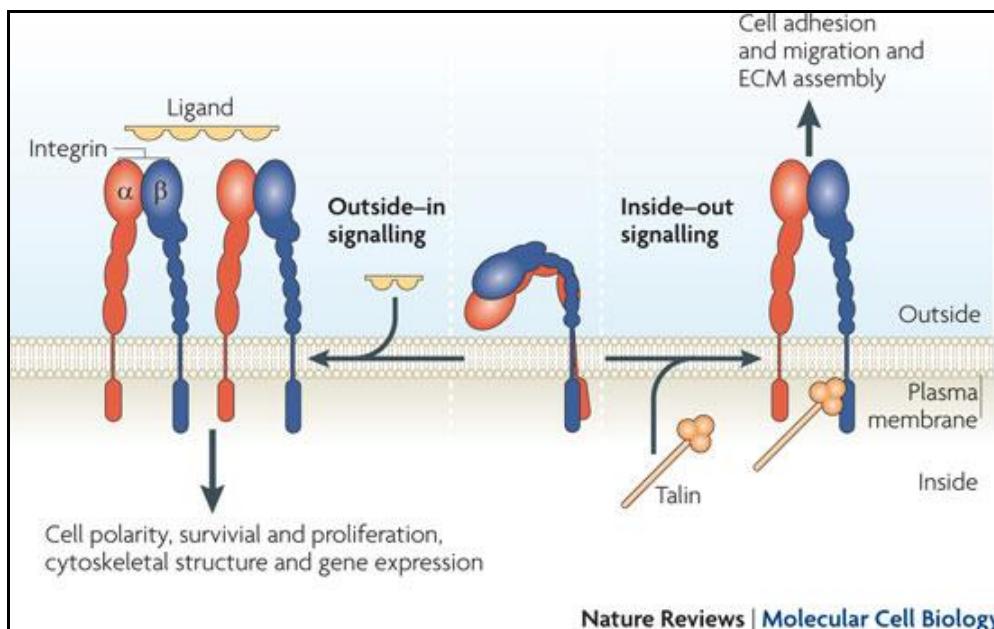


Figura 9: Sinalização bidirecional da integrina. Durante a sinalização de dentro para fora (*inside-out*), um ativador intracelular, como a talina se liga à cauda da β da integrina, induzindo a alterações conformacionais na estrutura da molécula, resultando em um aumento de afinidade para os ligantes extracelulares (integrina ativada). Na sinalização de fora para dentro (*outside-in*), a integrina se liga a componentes extracelulares, alterando sua conformação, favorecendo a aglomeração de outras integrinas no local e ativando vias de sinalização intracelular. Figura extraída de: <http://nature.com>. Acessado em: 14/02/2014

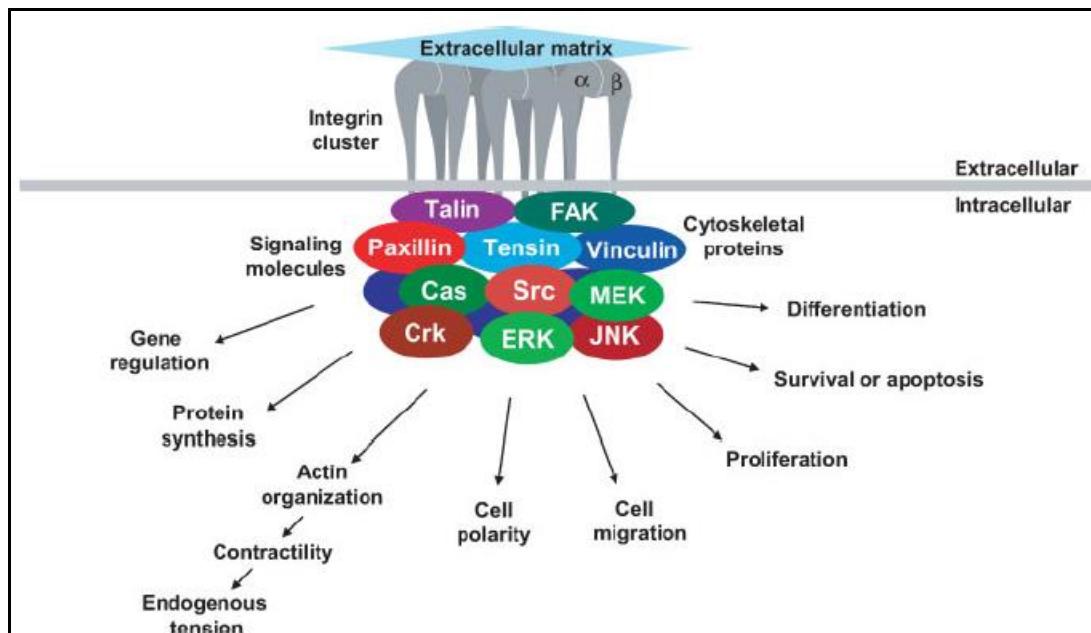


Figura 10: Modelo geral de adesões célula-matriz. As adesões célula-MEC contendo aglomerados de integrinas recrutam proteínas citoplasmáticas que, em cooperação com outros receptores de superfície celular, controla diversos processos, funções e fenótipos da célula. Figura extraída de: BARRIER, AL.; YAMADA, KM. Cell-matrix adhesion. Journal of Cellular Physiology, p.565, 2007.

Embora as interações com receptores integrina, sejam fisiologicamente importantes, esses receptores também estão associados a diversas condições patológicas. Tanto a função, quanto a expressão dos receptores integrina podem estar alterados em doenças em que a inflamação está associada a angiogênese, como observado em alguns tipos de neoplasias, como por exemplo na neoplasia mamária, cuja a expressão da subunidade β_1 da integrina, está associada a uma redução da sobrevivência de portadores desta neoplasia. Enquanto, a expressão elevada da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células tumorais é uma característica de metástase tumoral (PAOLILLO et al., 2009).

Neste sentido, têm se investido no estudo de moléculas que possuam a capacidade de interagir com os receptores integrina e assim, modular sua função. (YAN, 2013; MEYER et al., 2006). Dentre estas moléculas, os peptídeos solúveis contendo a sequência contendo a sequência RGD estão sendo amplamente estudados, pois competem pelo sítio RGD das integrinas impedindo-as de ligarem-se aos componentes e consequentemente de executarem sua função. Alguns desses peptídeos solúveis contendo a sequência RGD podem ser encontrados na peçonha de serpentes (GROOT et al., 2010; MEYER et al., 2006).

1.4 Peçonha das serpentes, desintegrinas e DisBa-01

A peçonha de serpentes é uma mistura complexa de proteínas e polipeptídeos bioativos, produzidos e estocados em uma glândula altamente especializada das serpentes, que após sua inoculação, funcionam como toxinas, atacando vários sistemas fisiológicos como a coagulação sanguínea e pressão arterial, que frequentemente pode levar à morte e debilitação da presa ou vítima (MATSUI et al., 2005; LEWIS, 2003).



Figura 11: Serpente com seus dentes inoculadores – Dentição solenóglifa, característica das serpentes da família *Viripidae*. Os dentes inoculadores são projetados para fora durante o ataque, permitindo ao animal inocular o veneno na presa. Figura extraída de: <http://zoodidatica.blogspot.com.br>. Acessado em: 10/02/2014

A peçonha, em sua maior parte, é composta por proteínas que podem ser classificadas como proteínas enzimáticas e não-enzimáticas, podendo exercer uma série de efeitos farmacológicos distintos que interferem com a cascata de coagulação, o sistema hemostático normal e o reparo tecidual (RAMOS et al., 2006) (Figura 12). Algumas dessas moléculas, na área clínica, tornaram-se modelos estruturais para o desenvolvimento de novos fármacos que fazem parte do tratamento de doenças trombóticas e hipertensivas tais como: Captopril®, Integrilin® e Agrastat®.

Um grupo em especial de moléculas presentes na peçonha que são capazes de romper as interações das células com a MEC. Esses componentes são denominados desintegrinas, as quais possuem uma sequência de aminoácidos RGD ou uma sequência semelhante ao RGD, que interage fortemente com os receptores integrinas (CALVETE, 2013).

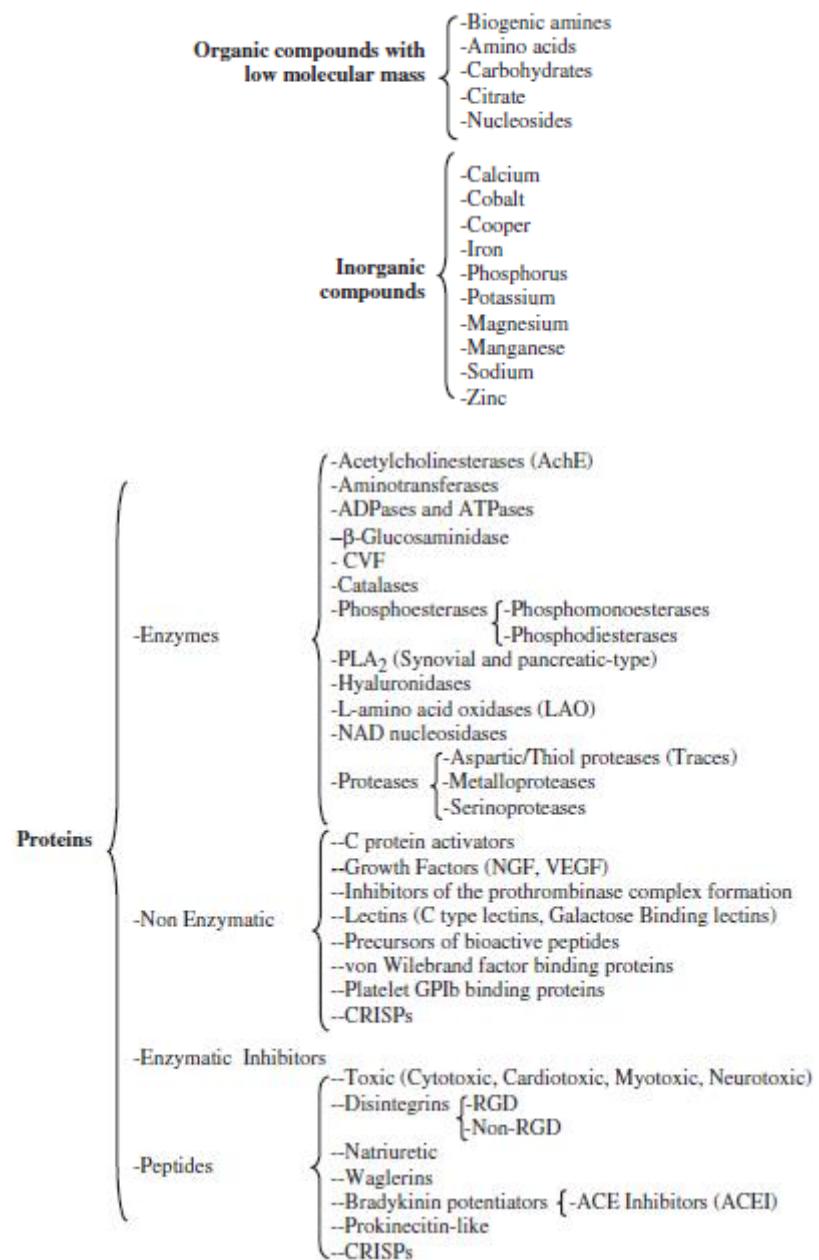


Figura 12: Compostos encontrados na peçonha de serpente. ACE: enzima conversora da angiotensina; CRISP: proteína secretora rica em cisteína; CVF: fator de veneno de cobra; LAO: L-amino ácido oxidase; PLA₂: fosfolipase A₂. Figura extraída de: RAMOS, OHP.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, HS. Snake Venom metalloproteases – Structure and function of catalytic and disintegrin domains. Biochemistry and Physiology, p.329, 2006.

Na literatura existem várias desintegritinas conhecidas (figura 13), essas desintegritinas podem exercer diferentes efeitos, tanto sobre componentes do microambiente tumoral, quanto da angiogênese (SELISTRE-DE-ARAUJO, 2010).

Disintegrin	Structure	Adhesive motif	Preferred integrin	Cognate ligand	Relevant inhibitory activity (conc.*)
salmosin 2	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (5 μ g)
saxatilin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis (100 nM)
jarastatin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_M\beta_2$	Vn, Fn, ICAM-1	melanoma lung metastasis ** (1 μ M)
flavoridin	monomeric medium	RGD	$\alpha_5\beta_1$	Fn	melanoma lung metastasis ** (1 μ M)
kistrin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma lung metastasis ** (1 μ M)
colombistatin	monomeric medium	RGD	nd	Fn	tumor cell migration (IC50 = 1.8 μ M)
trigramin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	bone metastasis **(100 μ g/ml)
DisBa-01	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma metastasis **(2 mg/Kg)
eristostatin	monomeric short	RGD	$\alpha_{II}\beta_3$	Fg	melanoma metastasis (25 μ g)
echistatin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	osteoclast migration (10 nM)
triflavin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis **(0.1–0.4 μ M)
contortrostatin	Homodimeric	RGD	$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$	Fn	tumor angiogenesis **(60 μ g/day)
alternagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_2\beta_1$	collagen I	angiogenesis **(1 μ M)
leberagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_6$	Vn, Fn	melanoma cell adhesion (100 nM)
acurhagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis **(0.4 μ M)
VLO5	heterodimeric	VGD, MLD	$\alpha_9\beta_1$	TN, VCAM	glioblastoma growth (100 μ g/ml)
obtustatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis **(0.4 μ g/ μ l)
viperistatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	melanoma cell transmigration (1–4 μ M)
lebestatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis **(0.1–0.5 μ g/embryo)

Tabela 1: Desintegrinas e seus efeitos biológicos – As desintegrinas podem exercer efeitos tanto em componentes do microambiente tumoral, incluindo efeitos sobre o processo angiogênico. Figura extraída do artigo: SELISTRE-DE-ARAUJO, HS et al. Snake Venom Desintegrin and Cell Migration. Toxins. p.2606-2621, 2010.

Dentre algumas desintegrinas estudadas está DisBa-01. Esta desintegrina foi publicada em um trabalho de Ramos e colaboradores (2008) na qual foi demonstrado que DisBa-01 possui efeitos anti-metastáticos e anti-angiogênicos tanto *in vivo*/ quanto *in vitro*. A DisBa-01 é uma desintegrina produzida de forma recombinante, contendo o motivo adesivo RGD, massa molecular de aproximadamente 12kDa, com afinidade a integrina $\alpha v\beta 3$ (Figura 13). Esta desintegrina é derivada da serpente *Rhinocerophis alternatus*, pertencente à família *Viperidae*, que compreende mais de 180 espécies.

A *Rhinocerophis alternatus*, culturalmente conhecida como Urutu, é encontrada no sudeste, sul, centro-oeste brasileiro, região central da Argentina e região meridional do Uruguai, habitando locais preferencialmente úmidos (ROCHA, 2005) (Figura 14). Esta serpente era denominada *Bothrops alternatus*. No entanto, em 2009, o gênero *Bothrops* foi reclassificado, com base em dados morfológicos e genes mitocondriais. Assim, o gênero *Bothrops* ficou restrito a serpente *Bothrops atrox*. As serpentes *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops Jararaca* passaram a pertencer ao gênero *Bothriopsis* e todas as outras serpentes passaram à

pertencer ao gênero *Rhinocerophis*. Em especial, a *Bothrops alternatus* passou a ser denominada *Rhinocerophis alternatus* (FENWICK, 2009).

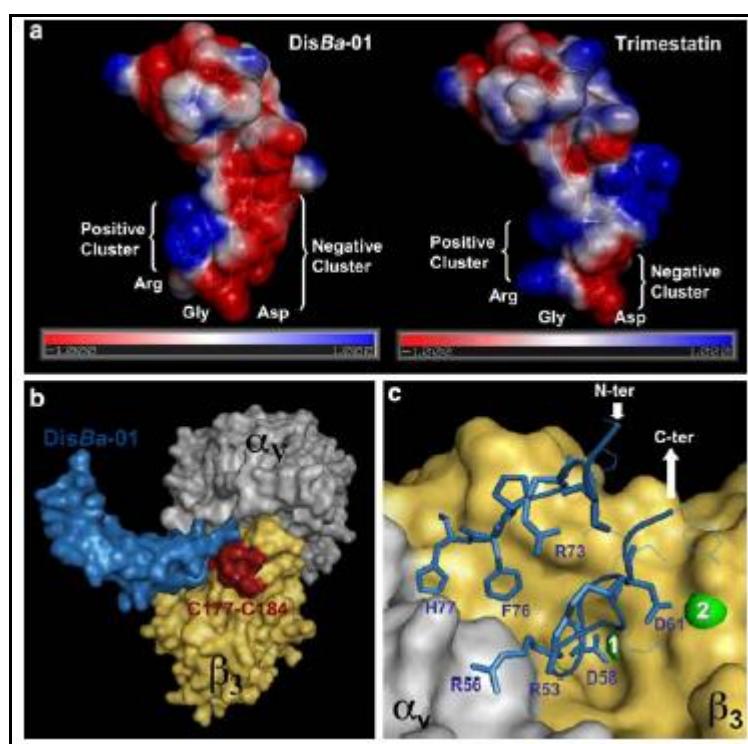


Figura 13 – Representação de DisBa-01 por cristalografia. Em (A) à esquerda DisBa-01, à direita Trimestatin, uma desintegrina bastante conhecida na literatura, demonstrando a semelhança de ambas as proteínas e seus motivos RGD. Em (B) O aspecto geral da cadeia da αv (cinza) e da cadeia $\beta 3$ (amarelo) da integrina e DisBa-01 (azul) no ligada no sítio RGD na $\alpha v\beta 3$. Em (C) zoom na região de interface entre DisBa-01 (estrutura em azul), αv integrina (cinza) e as cadeias $\beta 3$ (amarelas). Figura extraída de: RAMOS, OHP. et al. A novel $\alpha v\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. Clinical Experimental Metastasis, p.59, 2008.

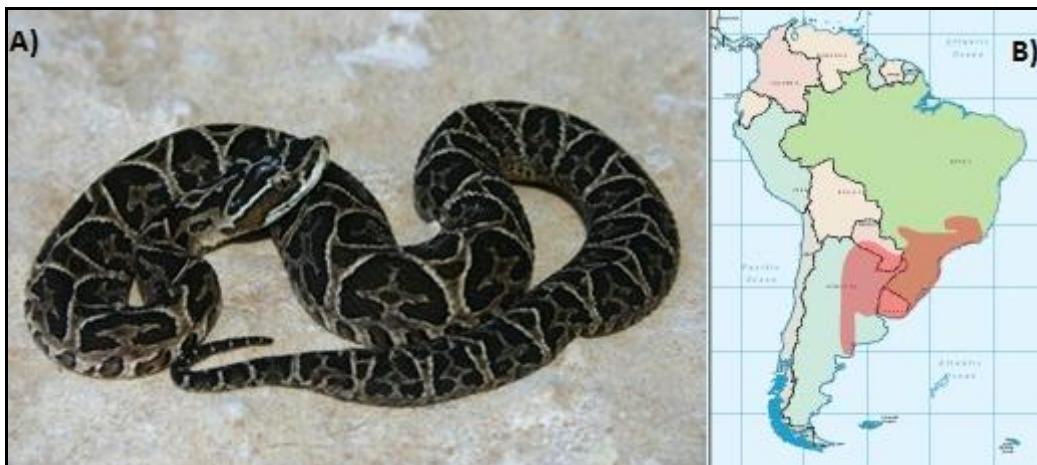


Figura 14: *Rhinocerophis alternatus*. Em (A), figura da serpente sua coloração é castanha, mas varia de tom mais claro (amarelado) para um mais escuro (marrom). Ao longo do corpo há desenhos que lembram uma ferradura ou gancho de telefone. Em (B), mapa mostrando sua ocorrência mais frequente na América do Sul. Figuras extraídas e modificadas de: http://cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_alternatus. Acessado em: 10/02/2014

Sendo assim, uma vez que desintegrinas sabidamente possam atuar sobre os processos de adesão, migração e diferenciação celular e que esses processos são importantes tanto para angiogênese, quanto para inflamação. Avaliar os efeitos de desintegrinas sobre componentes da resposta inflamatória e angiogênica, torna-se uma importante linha de pesquisa para a terapia de diversos processos patológicos em que estes dois processos ocorrem concomitantemente.

Para isso é necessário a utilização de modelos experimentais que além de possibilitar a avaliação dos componentes inflamatórios e angiogênicos de forma concomitante possibilite a avaliação de efeitos de drogas sobre os processos, que seja um modelo experimental facilmente reproduzível. Neste sentido o modelo experimental de implantes sintéticos representa o modelo mais adequado para avaliar os efeitos de desintegrinas na angiogênese inflamatória.

1.5 Modelo experimental de implantes sintéticos

O modelo experimental de implantes sintéticos em animais foi descrito inicialmente para o estudo do tecido fibrovascular proliferativo por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade e colaboradores, em 1987 para o estudo da angiogênese (Figura 15 e 16). A matriz implantada induz uma reação inflamatória tipo corpo estranho, com a formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, novos vasos sanguíneos e matriz extracelular, sendo envolvido por uma cápsula fibrosa (ARAUJO et al., 2010, MENDES et al., 2009, GRINDLAY et al., 1951).

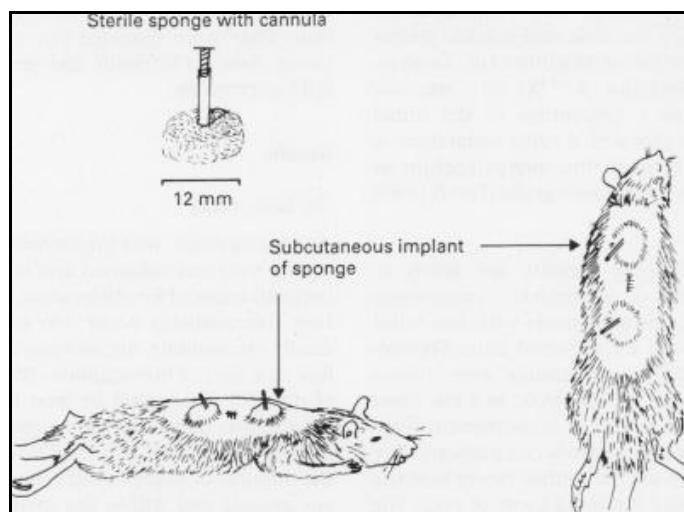


Figura 15: Modelo de implante sintéticos (1987) – A figura mostra um disco de implante sintético canulado e o arranjo das matrizes depois da implantação no tecido subcutâneo de um rato. Figura extraída de: ANDRADE, SP; FAN, TPD.; LEWIS, GP. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. The British Journal of Experimental Pathology. p.757. 1987.

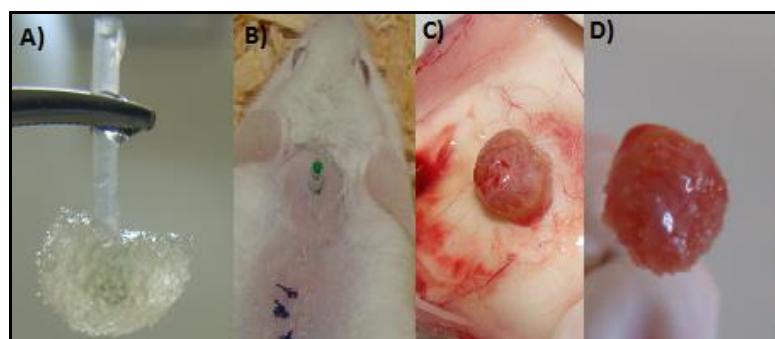


Figura 16: Fotos representativas do modelo experimental de implantes de sintéticos (atual). Em (A) uma matriz de sintética de poliéster-poliuretano. (B) A matriz canulada é implantada no tecido subcutâneo no dorso do camundongo. Em (C) A esponja implantada, induz uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho. Em (D) a matriz sintética é retirada para análise.

A utilização de implantes sintéticos permite o estudo do infiltrado inflamatório, da angiogênese, da deposição da matriz extracelular; permite também a análise bioquímica dos fluidos coletados, bem como avaliar o efeito de drogas sobre o processo (SARASWATI et al., 2011; MARQUES et al., 2011; XAVIER et al., 2010).

Este modelo experimental tem sido utilizado por ser facilmente reproduzível e possibilitar uma avaliação objetiva da angiogênese, inflamação e fibrose tecidual. O modelo também permite o monitoramento contínuo destes processos, tanto em condições normais quanto em condições patológicas (SARASWATI et al, 2013; BARCELOS et al, 2009).

Neste trabalho, utilizamos o modelo de implante sintético em camundongos para induzir o tecido fibrovascular no espaço subcutâneo e testar a hipótese de que o tratamento local com a desintegrina, DisBa-01 poderia inibir a inflamação e angiogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da desintegrina DisBa-01 na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos

2.1 – Objetivos específicos

- Avaliar através de parâmetros bioquímicos (Hb, NAG, MPO, colágeno) o efeito de DisBa-01 na angiogênico, inflamação e deposição de colágeno;
- Avaliar o fluxo sanguíneo dos implantes através da técnica de Laser Doppler;
- Determinar a influência deste composto na produção de citocinas pró- angiogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (VEGF, TNF- α , TGF- β 1, FGF, CXCL1/KC e CCL-2/JE/MCP-1);
- Avaliar morfologicamente a influência deste composto no número de vasos sanguíneos do tecido fibrovascular induzido por implantes sintéticos (HE).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com aproximadamente 7-8 semanas, pesando entre 30-35 gramas, provenientes do Instituto Vallé S.A e Pentapharm do Brasil LTDA (Uberlândia/MG). Os animais foram mantidos no depositário de animais do Departamento de Ciências Fisiológicas/UFU, com livre acesso a ração e água, ciclo claro/escuro; até o momento dos experimentos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia/Minas Gerais. Protocolo: CEUA nº 007/11.

3.2 Produção recombinante de DisBa-01

A desintegrina recombinante DisBa-01 foi produzida conforme descrito por Ramos e colaboradores (2008) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos e cedida pela Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo. A desintegrina DisBa-01 recombinante foi produzida e purificada a partir de uma fração de mRNA purificada da glândula de *Rhinocerophis alternatus* como descrita por Ramos e colaboradores (2008). A região codificada corresponde a uma desintegrina média (78 resíduos de aminoácidos) com um motivo RGD adesivo. A proteína fusão HIS-Tag produzida em *Escherichia coli* possui 12 kDa, como estimado por espectrometria de massa SDS-PAGE, mostrando sequência similar a uma variedade de membros da família das desintegrinas

3.3 Implantação da Matriz esponjosa

Implantes de poliéster-poliuretano foram utilizados para induzir a inflamação, angiogênese e fibrose no tecido subcutâneo do camundongo. Os implantes de 8 mm de diâmetro e 5 espessura mm foram canulados centralmente com cânulas de polivinil de 12mm de comprimento foram mantidos em álcool 70% v/v durante pelo menos 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos, conforme Araújo e colaboradores (2010).

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (xilazina e cetamina na proporção de 7,5: 10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via *i.m.*) e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70%. Em seguida, foi feita

uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele; e após delicada apartação do tecido subcutâneo, foi introduzido o disco de esponja. A cânula foi exteriorizada através de um orifício na pele da região cervical e sua extremidade superior ocluída com massa de modelagem. Finalmente, a incisão dorsal foi suturada.

Após a cirurgia os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até completo restabelecimento de suas funções vitais, sendo mais tarde distribuídos em gaiolas individuais.

3.4 Regime terapêutico com DisBa-01

DisBa-01 foi diluída em solução salina. Os animais foram divididos em quatro grupos com 9 animais cada. O grupo controle recebeu solução salina, enquanto os grupos tratados receberam diferentes doses de DisBa-01(10ng, 100ng e 1000ng). Os animais receberam injeções diárias intra-implante (subcutânea) contendo 10 μ l, com início 24 horas após a implantação até o 8º dia pós-implantação.

3.5 Remoção dos implantes

No 9º dia pós-implantação os animais foram eutanasiados com uma dose excessiva de anestésico (tiopental). Após a eutanásia, os discos de esponja foram retirados através de incisão mediana na região dorsal, em seguida, dissecados, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

3.6 Dosagem de hemoglobina (avaliação indireta da neovascularização)

A dosagem do conteúdo de hemoglobina foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett (1990) e Hu (1995). As amostras que apresentaram hemorragia ou infecção à análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada implante foi homogeneizado em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest) e as suspenções foram adicionados a microtubos (ependorff) de 2,0mL.

As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e os sobrenadante filtrados em filtros de 0,22 μ m (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de

uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante remanescente foi armazenado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de citocinas. O precipitado foi pesado para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

3.7 Avaliação da atividade de MPO (neutrófilos)

Para avaliar a atividade da mieloperoxidase utilizamos a técnica de Bradley (1982). Após a dosagem de hemoglobina, o precipitado (esponja) foi ressuspenso em 2,0mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,4. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, foram transferidos 300µL desse homogenato para microtubos (eppendorf) de 1,5mL e acrescentados 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Após nova homogeneização no vórtex as amostras foram congeladas para posterior dosagem.

Após o congelamento, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado em microtubos (eppendorf) de 1,5mL e a reação seguiu a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%; 100µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); adicionar 200µL do sobrenadante da amostra deixar reagir por 1 minuto cronometrado. Para interromper a reação, adicionou-se 100µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) a 4 M.

Em seguida, foram adicionados 200 µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica feita em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de atividade de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido do implante).

3.8 Avaliação da atividade de NAG (macrófagos)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Essa enzima foi utilizada como um índice da atividade destas células nos sítios inflamatórios através da técnica de Bailey, (1988) e adaptada para o modelo de implantes sintéticos por Barcelos e colaboradores (2004)

Após a utilização da esponja para dosagem de Hb, o precipitado foi ressuspenso em 2,0mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). As amostras foram homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugadas em 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

Para o ensaio, foram adicionados 100µL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Nas amostras, foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos.

Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. O pnitrofenol é o produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-n-acetil-β-Dglicosamina com a n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL⁻¹/mg de peso úmido do implante.

3.9 Dosagem de citocinas e quimiocinas

As citocinas avaliadas foram TNF-α, VEGF, FGF e TGFβ-1 e as quimiocinas CXCL-1/KC e CCL-2/JE/MCP-1. Para a avaliação das citocinas utilizou-se a reação imunoenzimática de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi congelado em freezer a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução de anticorpo monoclonal anti-camundongo para a citocina em análise e incubadas a 4°C overnight.

Em seguida, fez-se a lavagem da placa quatro vezes com 300µL/poço com Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,4. Posteriormente, foi adicionado na placa, o tampão de bloqueio (5% BSA em PBS, pH 7,4) , seguido de incubação por 1 hora.

Após nova etapa de lavagem, foram adicionados à placa, 100µL/poço dos padrões (15-1000 pg/mL) e das amostras, em seguida as placas foram novamente incubadas a 4°C overnight.

Após nova lavagem das placas, foram adicionados 100µL/poço de solução de anticorpo (biotinilado anti-camundongo) para a citocina em questão. As placas foram incubadas por 2 horas. Após lavagem, foram adicionados 100µL/poço de solução de estreptavidina-HRP e incubadas por 20 minutos. Após nova lavagem, foi realizada a reação

cromogênica com o substrato TMB (TMB - Sigma), 100 μ L/poço diluído em tampão citrato (acrescido de H₂O₂ 30 v/v), pH 5,0. Em seguida, as placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos.

A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ 1M e as placas analisadas em O.D. 540nm. Todos os passos de incubação (exceto aqueles overnight) foram feitos a temperatura ambiente. A concentração da citocina de cada implante foi calculada a partir de uma curva padrão e os resultados expressos em concentração de proteína (pg/mL) por implante.

3.10 Avaliação da deposição de colágeno

A deposição de colágeno foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total foi quantificada colorimetricamente baseada na reação do Picrossirius Red. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2008).

Sucintamente, as amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0,1% Triton X-100) depois da homogeneização, os debríss foram removidos pela centrifugação. Foram adicionados 50 μ L do reagente picrosirius red em 50 μ L da amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrossirius red foi separado por centrifugação a 10,000 durante 15 minutos, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1ml de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação com uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados foram expressos em μ g de colágeno por mg de implante. A pele de dois camundongos foi utilizada como controle positivo da técnica.

3.11 Imagem de perfusão por *Laser Doppler*

O equipamento de imagem de perfusão por *Laser Doppler* (MoorLDPI-2, Inglaterra) é utilizado para o monitoramento não-invasivo da circulação sanguínea, permitindo a avaliação do fluxo sanguíneo na microcirculação. A técnica permite o acompanhamento de alterações no fluxo de uma área ao longo do tempo ou a avaliação de diferenças no fluxo entre mais de uma área.

A técnica baseia-se no princípio de *Doppler* em que a luz de um laser monocromático incide sobre o tecido onde é, então, dispersa pelas hemácias em movimento e, como consequência, a frequência é ampliada, a luz é então fotodetectada e processada de forma a construir um mapa codificado de cores do fluxo sanguíneo.

Quando o procedimento de escaneamento da área de interesse é finalizado, a perfusão do tecido é codificada em um mapa de cores. Pouca ou nenhuma perfusão é apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão em vermelho (Figura 16).

No presente estudo, foi realizado um novo experimento, seguindo o mesmo regime terapêutico e o número de animais. Os animais foram anestesiados previamente com quetamina/xilazina (xilazina e cetamina na proporção de 7,5: 10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via *i.m.*) e depilados na região de implantação da esponja. Posteriormente, a região de interesse foi escaneada por um laser (830nm) imediatamente após a implantação e nos tempos de 3, 6 e 8 dias após a implantação. O resultado foram obtidos a partir da avaliação das imagens obtidas pelo *Laser Doppler*.

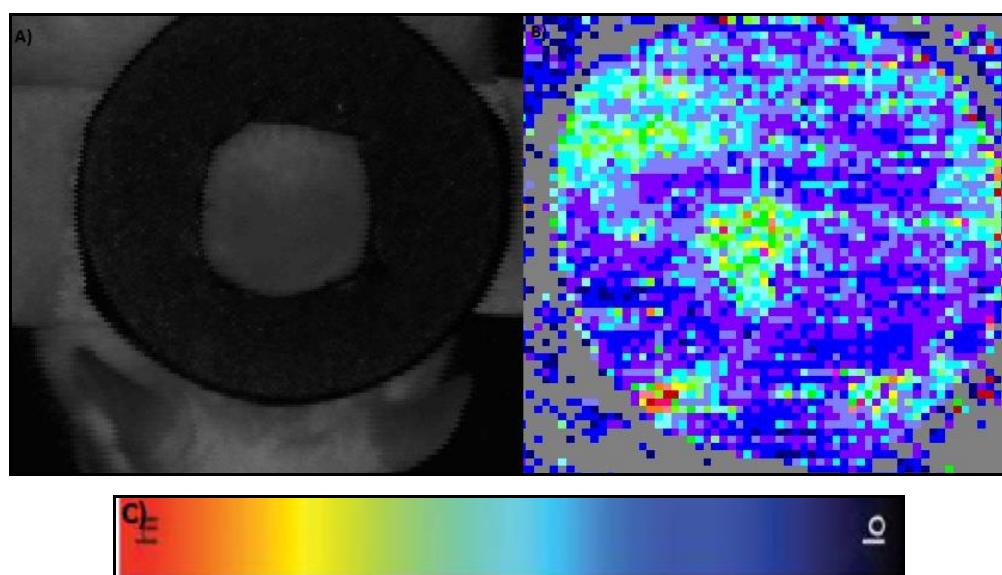


Figura 16: Exemplo da análise por *Laser Doppler* - Em (A) seleciona-se a região a ser escaneada. Em (B) a luz do laser é dispersa pelo movimento das hemácias, a frequência é ampliada, foto detectada e processada em forma de um mapa de cores. Em (C) Escala de cores que codificam o fluxo sanguíneo nas imagens de perfusão por laser Doppler, quanto mais vermelho maior é o fluxo e quanto mais azul menor é o fluxo.

3.12 Análises histológicas das matrizes sintéticas

Realizou-se um novo experimento, seguindo o mesmo regime terapêutico. Após a retirada dos implantes, os implantes foram cuidadosamente fixados em solução de methacarn.

Os implantes foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo (secções de 5 µm) e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E), para avaliação do infiltrado inflamatório, formação de conjuntivo e vascularização. Os cortes histológicos corados em HE foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X). Cada corte teve o registro fotográfico de pelo menos 10 campos. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Histologia (UFU).

3.13 Análises estatísticas

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

4. RESULTADOS

A matriz esponjosa foi bem tolerada por todos os animais. Nenhum sinal de infecção ou rejeição do implante foi observado no local de implantação da esponja. Os animais também não apresentaram sinais toxicidade (perda de peso, apatia, alterações motoras).

4.1 Efeitos do tratamento com DisBa-01 na inflamação

A DisBa-01 inibiu o componente inflamatório do tecido fibrovascular induzido por implantes.

O componente inflamatório foi determinado pela presença de leucócitos presentes nos implantes, bem como pela produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação.

O conteúdo tecidual total dos implantes foi avaliado a partir da avaliação do peso úmido dos implantes. O tratamento com DisBa-01 foi capaz de diminuir o infiltrado fibrovascular nas doses de 100 e 1000ng; 75.22 ± 6.89 (controle) versus 57 ± 4.79 (10ng) 54.12 ± 3.74 (100ng) e 53.30 ± 1.55 (1000ng) (gráfico 1).

O tratamento com DisBa-01 diminuiu significativamente e de madeira dose dependente o conteúdo de neutrófilos avaliado de forma indireta através da atividade de MPO nas três doses avaliadas 12.24 ± 0.55 (controle) versus 10.26 ± 0.69 (10ng), 8.48 ± 0.84 (100ng) e 7.43 ± 0.28 (1000ng) (gráfico 2). Esse mesmo perfil de redução dose dependente foi observado nos níveis da quimiocina para neutrófilos CXCL-1/KC; 4.24 ± 0.35 (controle) versus 3.13 ± 0.24 (10ng), 2.59 ± 0.29 (100ng) e 1.95 ± 0.20 (1000ng) (gráfico 3).

A avaliação do conteúdo de macrófagos através da atividade da enzima NAG apresentou redução significativa na dose de 100ng; 3.27 ± 0.40 (controle) versus 3.26 ± 0.55 (10ng), 3.19 ± 0.24 (100ng) e 1.90 ± 0.28 (1000ng) (gráfico 4). Esse efeito também foi acompanhado por uma redução significativa nos níveis da quimiocina recrutadora de macrófagos CCL2/JE/MCP-1 nas doses de 100 e 1000ng; 2.63 ± 0.29 (controle) versus 2.52 ± 0.24 (10ng), 1.80 ± 0.18 (100ng) 1.49 ± 0.16 (1000ng) (gráfico 5).

Os efeitos da DisBa-01 sobre os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α também mostram uma diminuição significativa na dose de 1000ng; 9.34 ± 0.83 (controle) versus 8.97 ± 0.59 (10ng), 7.54 ± 0.68 (100ng) e 4.31 ± 0.83 (1000ng) (gráfico 6).

Em conjunto, esses dados demonstram que o tratamento com DisBa-01 foi capaz de inibir diferentes componentes do processo inflamatório.

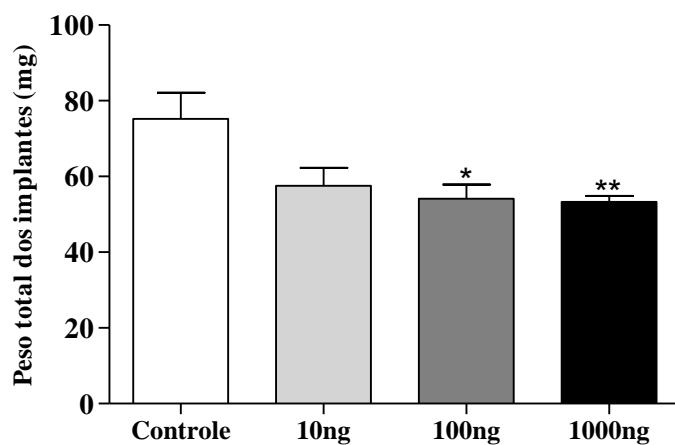


Gráfico 1: Efeito do tratamento com DisBa-01 sobre o peso úmido dos implantes de esponja. O peso úmido dos implantes de esponja mostrou-se significativamente reduzido nos implantes tratados com as doses de 100ng, e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. * p<0,05; **p<0,01

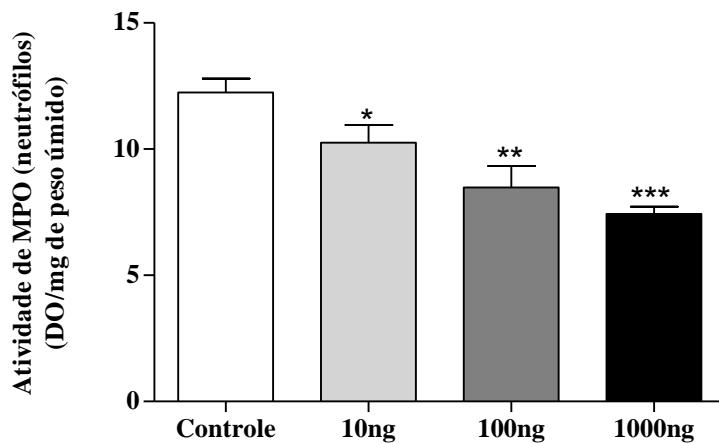


Gráfico 2: Efeito do tratamento com DisBa-01 na atividade enzimática de mieloperoxidase. A atividade de MPO mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. * p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

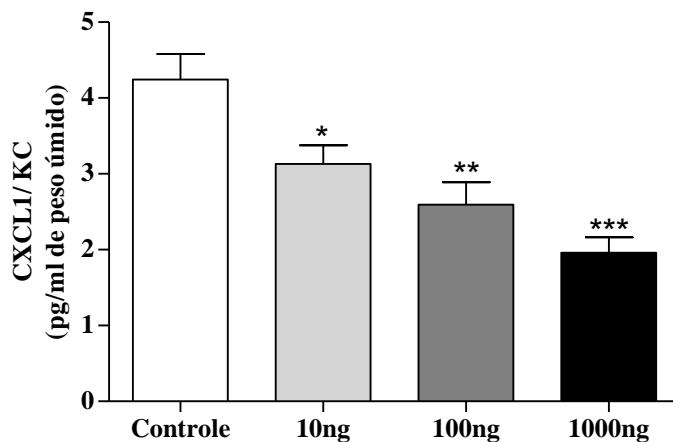


Gráfico 3: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de CXCL-1/KC. A concentração de CXCL-1/KC mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. * p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

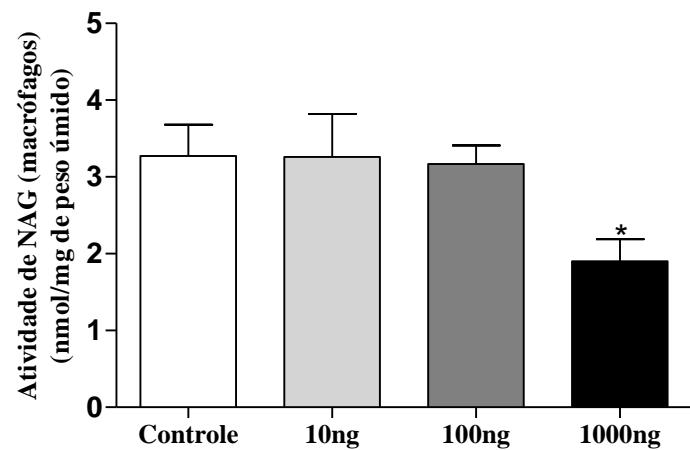


Gráfico 4: Efeito do tratamento com DisBa-01 na atividade enzimática N-acetil- β -D-glicosaminidase. A atividade de NAG mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com a dose de 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. * p<0,05.

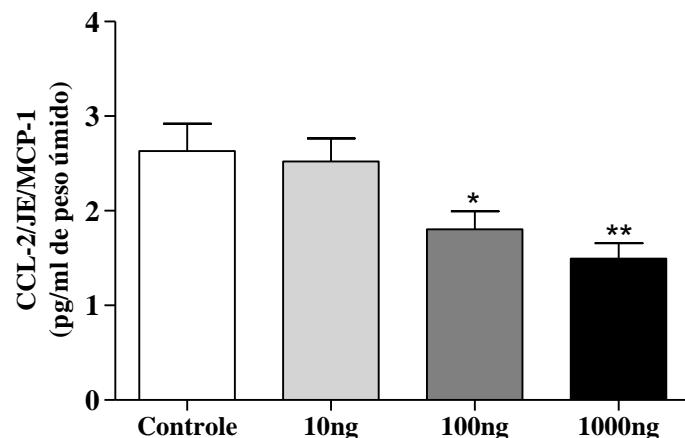


Gráfico 5: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de CCL-2/JE/MCP-1. A concentração de MCP-1 mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com as doses de 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. * p<0,05 e **p<0,01

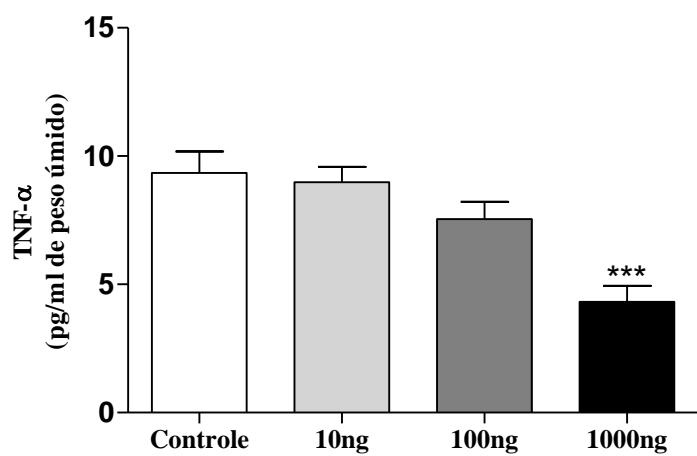


Gráfico 6: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de TNF- α . A concentração de TNF- α mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com a dose de 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. ***p<0,001

4.2 Efeitos do tratamento com DisBa-01 na angiogênese

A DisBa-01 inibiu o componente angiogênico do tecido fibrovascular induzido por implantes.

A angiogênese foi determinada por diferentes técnicas: indiretamente através da dosagem do conteúdo de hemoglobina nos implantes e pela técnica de imagem de perfusão por *Laser Doppler*. Diretamente pela contagem de vasos sanguíneos em cortes histológicos e através pela concentração das citocinas VEGF e FGF nos implantes. Em todos os parâmetros avaliados, o tratamento com DisBa-01 diminuiu significativamente o processo angiogênico.

A avaliação do conteúdo de hemoglobina mostrou uma redução significativa nas três doses avaliadas conforme mostrado pelo gráfico 7; 3.67 ± 0.2 (controle) versus 2.22 ± 0.23 (10ng), 1.84 ± 0.24 (100ng) e 1.73 ± 0.1 (1000ng), sugerindo uma redução na angiogênese.

A avaliação do perfil histológico dos implantes é importante por demonstrar a crescente invasão de vasos sanguíneos neoformados, células inflamatórias e fibroblastos, que culminam com a formação de um tecido de granulação característico de um processo de reparação tecidual. Para isso, quantificamos os vasos sanguíneos em cortes histológicos dos implantes de esponja (figura 17), conforme ilustrado no gráfico 8, o tratamento com DisBa-01 diminuiu de forma significativa o número de vasos nas três doses, corroborando nossos achados na quantificação da hemoglobina; $17.02 \pm 0.97/\text{campo}$ (controle) versus $8.43 \pm 0.48/\text{campo}$ (10ng), $6.53 \pm 0.9/\text{campo}$ (100ng) e $5.52 \pm 0.56/\text{campo}$ (1000ng). Essa inibição foi acompanhada pela redução dos níveis das citocinas pró-angiogênicas VEGF e FGF. Os níveis de VEGF no implante foram reduzidos nas três doses avaliadas; 1.96 ± 0.10 (controle) versus 0.65 ± 0.10 (10ng) e 0.34 ± 0.06 (1000ng) (gráfico 9); enquanto que os níveis de FGF foram reduzidos nas doses de 100 e 1000ng; 2.23 ± 0.07 (controle) versus 2.20 ± 0.10 , 1.76 ± 0.10 (100ng) e 1.30 ± 0.04 (1000ng) (gráfico 10).

Os efeitos anti-angiogênicos de DisBa-01 foram confirmados pela técnica de imagem de perfusão por *Laser Doppler* a qual mostrou redução significativa do fluxo sanguíneo, a partir do terceiro dia de implantação, na dose de 1000ng quando comparados aos animais do grupo controle (gráfico 11 e quadro 1). Em conjunto, esses dados confirmam os efeitos anti-angiogênicos da DisBa-01.

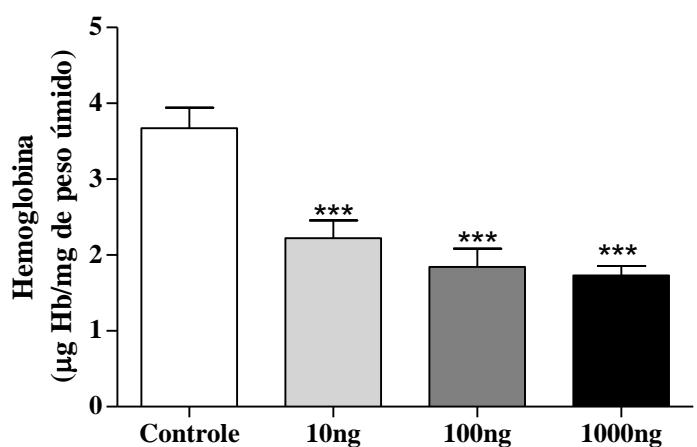


Gráfico 7: Efeito do tratamento com DisBa-01 concentração de hemoglobina. A angiogênese foi avaliada através do conteúdo de Hb nos implantes, o qual mostrou-se significativamente reduzido nos implantes tratados com as doses de 10, 100 e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. *** $p<0,001$

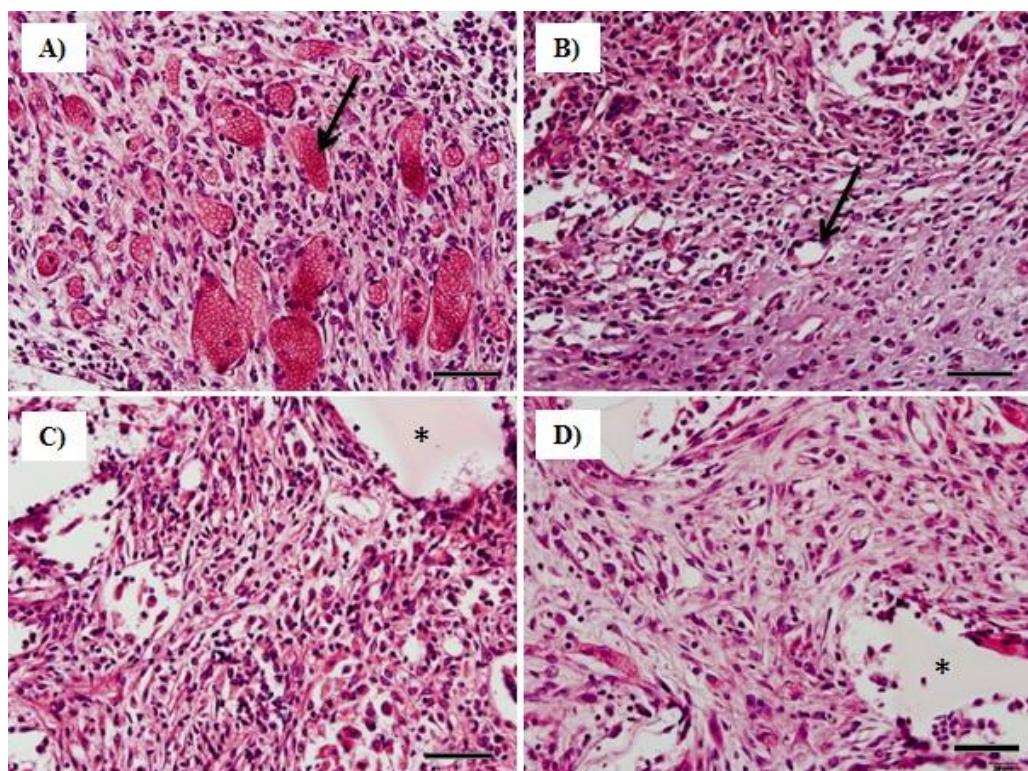


Figura 17: Cortes histológicos do tecido fibrovascular (5 μm , corados com H&E). O tecido recém formado é composto de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. Em (A) o tecido fibrovascular do controle é mais vascularizado comparado com os grupos tratados com DisBa-01 nas doses de 10ng (B) 100ng (C) e 1000ng (D). Setas pretas representam vasos sanguíneos e * representam a matriz sintética - Barra - 20 μm .

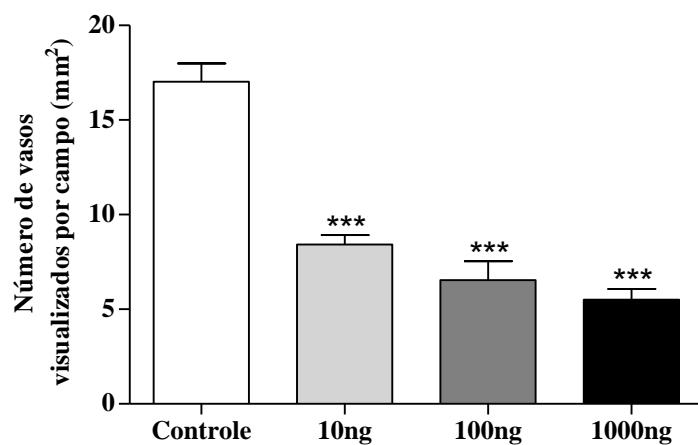


Gráfico 8: Quantificação do número de vasos sanguíneos. O número de vasos sanguíneos mostrou-se significativamente reduzido nos implantes tratados com as doses de 10, 100 e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 8 animais. *** p<0,001

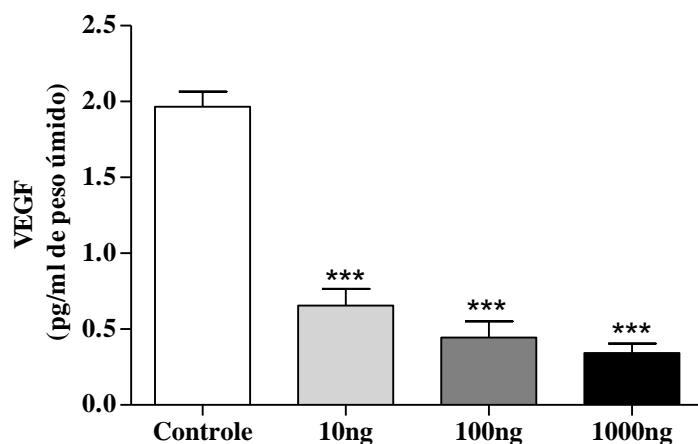


Gráfico 9: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de VEGF. A concentração de VEGF mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. *** p<0,001

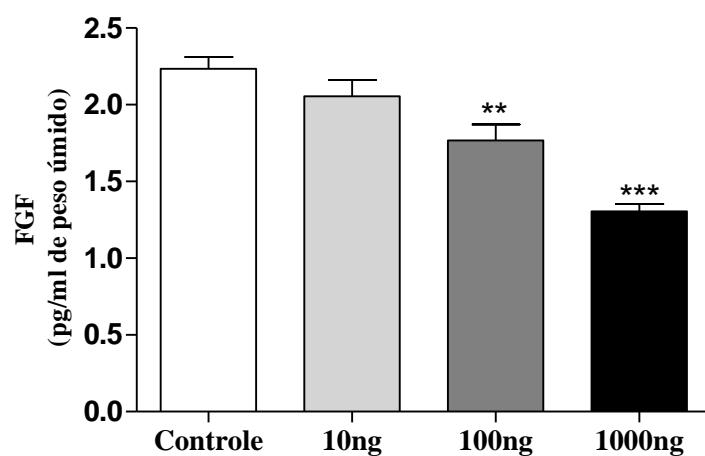
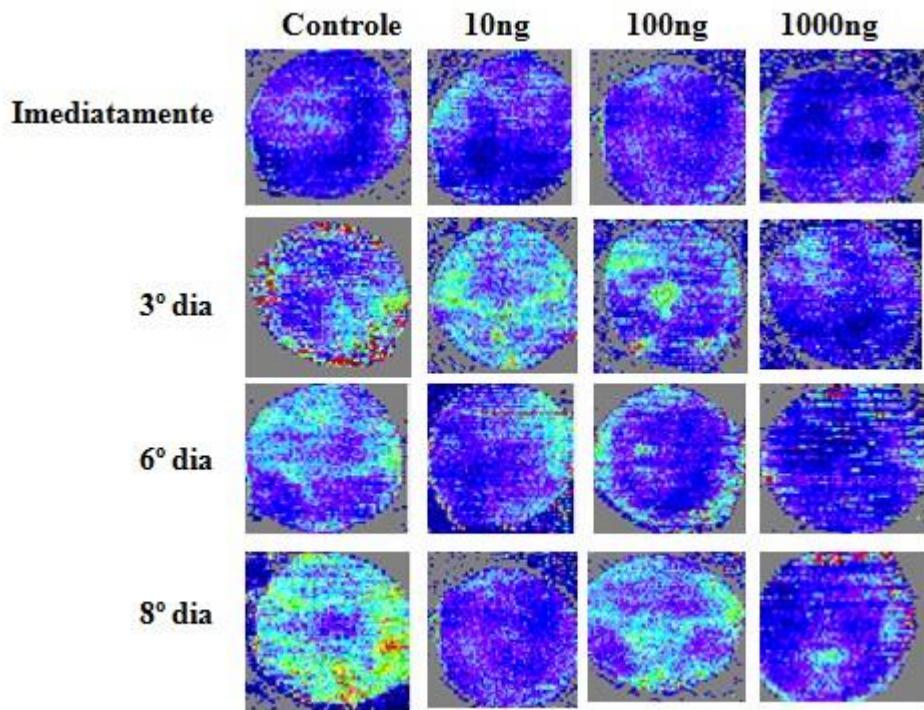


Gráfico 10: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de FGF. A concentração de FGF mostrou-se significativamente reduzida nos implantes tratados com as doses de 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais. **p<0,01, *** p<0,001

A)



B)

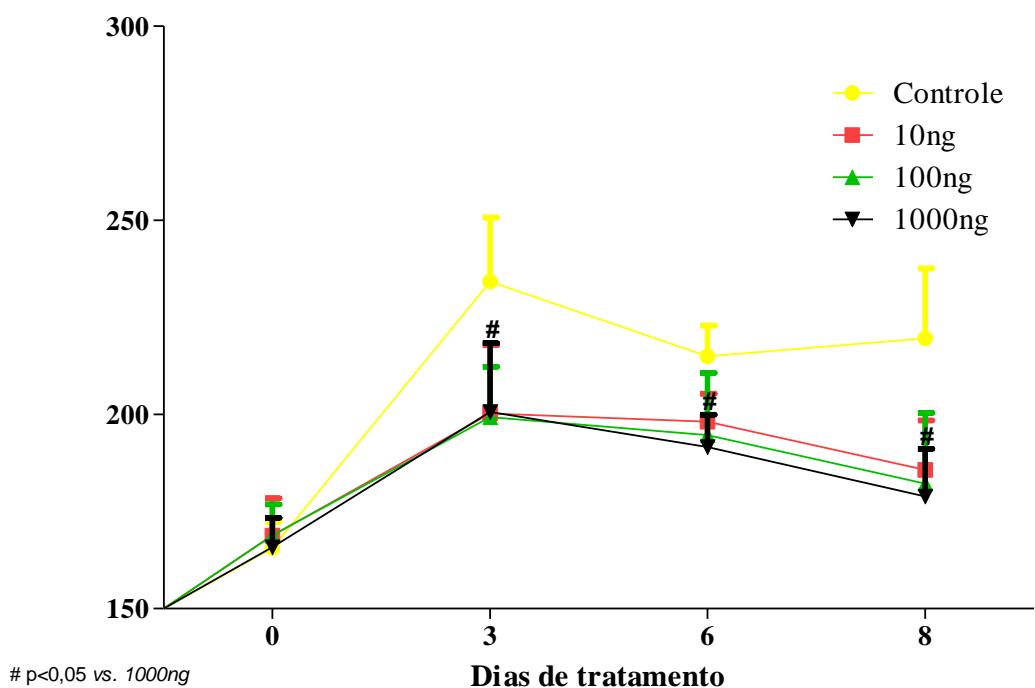


Gráfico 11: Avaliação do fluxo sanguíneo dos implantes sintéticos através de imagem por Laser Doppler - O fluxo sanguíneo foi avaliado imediatamente, no 3º, 6º e 8º dia após a implantação da matriz sintética. Em (A) imagens representativas do fluxo sanguíneo no implante. Em (B) cinética de fluxo sanguíneo no implante. O fluxo sanguíneo mostrou-se reduzido nos implantes tratados com a dose de 100ng DisBa-01.

4.3 Efeitos da DisBa-01 sobre a deposição de colágeno

A DisBa-01 não alterou o componente fibrogênico do tecido fibrovascular induzido por implantes.

O tratamento de DisBa-01 não promoveu alterações significativas na deposição de colágeno 0.31 ± 0.03 (controle) versus 0.31 ± 0.03 (10ng), 0.28 ± 0.02 (100ng) e 0.28 ± 0.02 (1000ng) (gráfico 10 e figura 18). A concentração de TGF β também não foi alterada pelo tratamento com DisBa-01 3.11 ± 0.29 (controle) versus 3.12 ± 0.20 (10ng), 3.14 ± 0.26 (100ng) e 3.14 ± 0.23 (1000ng). Em conjunto, nossos dados demonstram que DisBa-01 modula angiogênese e inflamação sem interferir no processo de reparo tecidual.

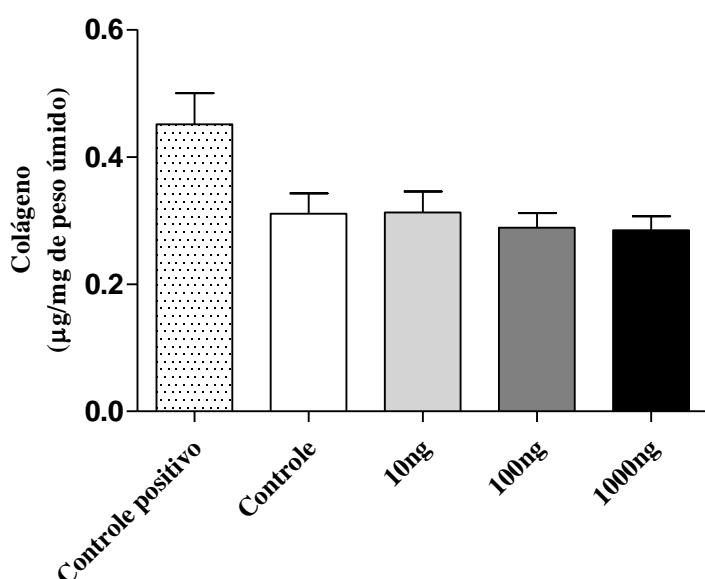


Gráfico 12: Efeito do tratamento com DisBa-01 na deposição de colágeno. Não houve alterações na deposição de colágeno com o tratamento com DisBa-01 em nenhuma das doses. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais

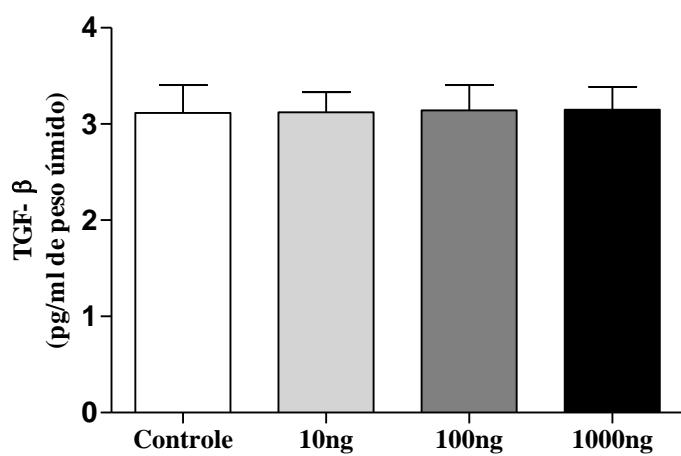


Gráfico 13: Efeito do tratamento com DisBa-01 na concentração de TGF β . O tratamento com DisBa-01 não promoveu alterações na concentração de TGF β em nenhuma das doses estudadas . Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 9 animais

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliou-se os efeitos da desintegrina DisBa-01 na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos. O modelo experimental murino de implantes sintéticos, induz a formação de um tecido fibrovascular rico em vasos neoformados, células inflamatórias e deposição de MEC. Esse modelo tem possibilitado o estudo da modulação de compostos com potenciais terapêuticos sobre os componentes chave desse tecido fibrovascular (angiogênese, inflamação e reparo) (ARAÚJO, et al. 2011; ARAÚJO et. al, 2010; BARCELOS et al. 2009).

Os diversos tipos de células envolvidas na angiogênese inflamatória devem assimilar e responder, continuamente, a sinais complexos de informações do meio extracelular, as quais regulam fenômenos como: recrutamento, migração, sobrevivência e diferenciação celular (HERTER et al. 2013; ZARBOCK et al. 2012).

As integrinas são receptores transmembranas capazes de detectar, interpretar e distribuir informações complexas, atuando para a célula como grandes centros funcionais (BOUVARD, 2013). Assim, falhas nos mecanismos de regulação desses receptores podem contribuir de maneira significativa na manutenção de diversas condições patológicas como artrite reumatoide, doenças trombóticas e o câncer (MARELLI et al. 2013; LOWIN et al. 2011).

Neste sentido, moléculas capazes de interagir com integrinas ou bloqueá-las, estão sendo amplamente estudadas como estratégia terapêutica. O antagonista de baixo peso molecular de integrinas α_v (EMD121974 ou Cilengitide) e o anticorpo humano anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ (LM609 ou Vitaxin) por exemplo, estão sendo testados em ensaios clínicos para avaliar seus efeitos terapêuticos na metástase tumoral em humanos (BLEDZKA et al., 2013).

As desintegrinas são polipeptídeos presentes na peçonha de serpentes, que inibem significativamente as funções das integrinas (CALVETE, 2013). A desintegrina DisBa-01 é uma desintegrina recombinante, derivada da peçonha da serpente *Rhinocerophis alternatus*, que interage com afinidade à integrina $\alpha_v\beta_3$ (RAMOS et al., 2008).

Nossos resultados mostraram atividade inibitória da DisBa-01 na formação de alguns componentes do tecido fibrovascular induzido por implantes, exceto nas concentrações de

colágeno. Essa atividade inibitória sobre componentes do tecido pode ser visto pela redução do peso úmido dos implantes. Esse efeito inibitório foi evidenciado pela redução dos componentes inflamatórios, como o conteúdo de neutrófilos (MPO), das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , CCL2/JE/MCP-1 e CXCL-1/KC. A inibição do componente angiogênico, foi observada pela redução do conteúdo de hemoglobina nos implantes, análise do fluxo sanguíneo por imagem de perfusão por *Laser Doppler*, contagem de vasos e das citocinas pró-angiogênicas VEGF e FGF. Entretanto, DisBa-01 não apresentou efeitos sobre o componente fibrogênico, avaliado pela quantificação bioquímica do colágeno solúvel e pela citocina pró-fibrogênica TGF- β .

O componente inflamatório foi avaliado pela mensuração da atividade das enzimas inflamatórias MPO (representando a atividade de neutrófilos) e NAG (representando a atividade de macrófagos). Também foram quantificados os níveis da citocina inflamatória TNF- α e das quimiocinas CXCL-1/KC (quimiotáxica para neutrófilos) e CCL-2/JE/MCP-1 (quimiotáxica para macrófagos), presentes no implante.

Os neutrófilos são atraídos para o sítio inflamatório através de fatores quimiotáticos, como o CXCL1/KC e, quando ativados, liberam uma série de mediadores inflamatórios e substâncias nocivas como espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂ (MOCSAI et al. 2013). Nathan e colaboradores (1987) demonstraram *in vitro*, que as interações com a MEC, mediadas por integrinas β 2, são essenciais na liberação do conteúdo de seus grânulos como por exemplo a secreção de H₂O₂ pelos neutrófilos durante a resposta inflamatória.

Quando ativados, os neutrófilos, também liberam o conteúdo de seus grânulos, que contêm, principalmente, a enzima MPO. Embora tenha um papel protetor contra agentes infecciosos, esta enzima pode agir de forma parácrina sobre outros neutrófilos, estimulando-os a liberarem o conteúdo de seus grânulos, o que contribui para a lesão tecidual (BURG, 2001). De forma semelhante à secreção H₂O₂, a secreção de MPO também parece ser dependente de interações com a MEC.

Jerke e colaboradores (2013) demonstraram *in vitro* (co-cultura neutrófilos com células endoteliais da veia de cordão umbilical humano - HUVECs) que, neutrófilos ativados transferem MPO para células endoteliais através de um contato íntimo, célula-célula, mediados pela integrinas do tipo β 2. Ao bloqueá-las com anticorpos anti-integrinas, observou uma diminuição da atividade de MPO, sugerindo um possível mecanismo de ação na

inflamação, na qual a MPO é transferida para células endoteliais e, posteriormente, disponibilizada para o MEC.

O tratamento com DisBa-01, foi capaz de reduzir significativamente, em todas as doses estudadas, a atividade de MPO, sugerindo uma redução no conteúdo de neutrófilos. A redução da atividade de MPO foi acompanhada por uma redução nos níveis da citocina quimiotáxica para neutrófilos CXCL-1/KC. Esta quimiocina é considerada uma das principais quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos, os quais são recrutados a partir da circulação sanguínea em direção a locais de inflamação, devido a sinais emitidos principalmente pela secreção de quimiocinas em resposta a lesão tecidual (KOLACZKOWSKA, 2013). Zhang e colaboradores (2001) demonstraram *in vivo* (microscopia intravital no músculo cremaster) que, a CXCL-1/KC sozinha é capaz de induzir a expressão de moléculas adesivas em neutrófilos, em todas as etapas do processo do seu recrutamento.

Em trabalhos anteriores, já foi demonstrado que, as desintegrinas derivadas da peçonha de serpentes podem atuar regulando as funções dos neutrófilos de diferentes maneiras. Coelho e colaboradores (1999) ao avaliarem o efeito da Jarastatin, observaram a inibição na migração e quimiotaxia de neutrófilos tanto *in vitro* (cultura de PMN) quanto *in vivo* (modelo de indução por carregenina). Contradicorriamente, Mariano-Oliveira e colaboradores (2003), ao avaliarem *in vitro* o efeito de Alternagina-C, observaram que esta desintegrina induz a migração de neutrófilos. Um efeitos anti-inflamatório, também foi evidenciado por Tseng e colaboradores (2004) em um estudo *in vitro* da desintegrina Rhodostomin, demonstrando que o bloqueio dos sítios adesivos RGD, mediados pela $\alpha_{IIb}\beta_3$, pode atenuar a produção de superóxido por neutrófilos. Esses estudos demonstram a complexidade dos efeitos das desintegrinas sobre neutrófilos na resposta inflamatória.

O tratamento com DisBa-01 também promoveu uma redução da atividade de NAG, sugerindo uma redução no conteúdo de macrófagos no local. Essa redução foi acompanhada de um efeito inibitório sobre a concentração de CCL-2/JE/MCP-1. Essa quimiocina está relacionada com o recrutamento e ativação de monócitos durante a resposta inflamatória (PEDERSEN et al., 2011). A CCL2/JE/MCP-1 desempenha um importante papel em diversas condições patológicas, no câncer de próstata, por exemplo, a compreensão do papel desta quimiocina, a identificou como um importante alvo terapêutico (ZHANG et al., 2014). Esses

resultados sugerem que DisBa-01 age tanto sobre o recrutamento de neutrófilos, quanto sobre o recrutamento de monócitos/ macrófagos.

Saegusa e colaboradores (2008), em um estudo *in vitro* (monócito de linfoma humano) associado a ensaios de modelagem computacional, demonstraram que, as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_4\beta_1$ são importantes na proliferação de monócitos. Também demonstraram que, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_4\beta_1$ funcionam como receptores e mediadores das ações pró-inflamatórias da fosfolipase A₂ grupo IIA (PLA2- IIA).

Hsu e colaboradores (2010) demonstraram atividades anti-inflamatórias da desintegrina Rhodostatin em um modelo de endotoxemia murina induzida por LPS. A Rhodostatin foi capaz de inibir a ativação, migração e adesão de macrófagos. Além disso, demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em macrófagos e monócitos inibe a expressão de importantes citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL10, IL-6, IL-1 β).

O tratamento com DisBa-01, também inibiu os níveis da citocina pró-inflamatória (TNF- α). Existem evidências que, as desintegrinas derivadas da peçonha da serpente, exercem efeitos inibitórios na redução desta citocina. Kim e colaboradores (2006) demonstraram os efeitos inibitórios de Saxatilin sobre a proliferação e invasão de células do câncer de ovário humano (linhagem MADAH 2274). Saxatilin, também foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α .

A via de ativação de TNF- α é uma das principais vias envolvidas na indução do fator de transcrição NF- κ B, que regula a transcrição de diferentes tipos de genes envolvidos na resposta inflamatória (ALLAVENA et al. 2011). Trabalhos anteriores demonstram que o bloqueio do receptor integrina pode regular a via NF- κ B, como no trabalho de Lin e colaboradores (2013) demonstraram as ações de D-pinitol, um composto encontrado em alimentos como a soja e legumes. D-pinitol inibe, *in vitro*, a migração e invasão de células do câncer de próstata humano, através da diminuição da expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$, e consequentemente, reduzindo os níveis da via de transcrição de NF- κ B, sugerindo um possível mecanismo de atuação entre $\alpha_v\beta_3$ e NF- κ B.

A citocina TNF- α , na inflamação, age principalmente sobre o endotélio vascular, promovendo vasodilação, estimulando a expressão de moléculas envolvidas na adesão de leucócitos (ICAM-1, E-selectina) e estimulando a produção e secreção de quimiocinas (CHU, 2013; MADGE, 2001). Com relação a angiogênese, TNF- α induz a proliferação de células

endoteliais *in vitro* (REN, 2013) e *in vivo* promove angiogênese no modelo de implantes de esponja (BARCELOS et al. 2005).

O tratamento com DisBa-01 mostrou um potente efeito anti-angiogênico em todos os parâmetros avaliados. Nos ensaios realizados observou-se uma diminuição da concentração de hemoglobina nos implantes, uma redução do número total de vasos sanguíneos em cortes histológicos e redução do fluxo sanguíneo nos implantes. A cinética realizada pelo aparelho de imagens de perfusão por *Laser Doppler* indicou que, DisBa-01 é capaz de produzir efeitos inibitórios no fluxo sanguíneo logo no início do tratamento (3º dia). Assim, a diminuição precoce da neovascularização na inflamação crônica, reduziria o infiltrado inflamatório e consequentemente o suprimento com citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas no local (o que explicaria os efeitos anti-inflamatórios de DisBa-01). O tratamento com DisBa-01, também promoveu uma redução significativa da concentração das citocinas pró-angiogênicas VEGF e FGF.

Os efeitos anti-angiogênicos das desintegrinas já foram relatados. Olfa e colaboradores (2005) em um estudo com Lebestatinn observaram efeitos inibitórios na angiogênese, tanto *in vitro* (células de adenocarcinoma), quanto *in vivo* (modelo de membrana corioalantóica). Jang e colaboradores (2007) avaliaram os efeitos de Saxatilin sobre células de câncer mamário e observaram uma inibição da expressão de VEGF e do fator indutor de hipóxia 1 alpha (HIF-1 α).

Alguns efeitos inibitórios da DisBa-01 sobre a angiogênese também já foram identificados. Ramos e colaboradores (2008) demonstraram *in vivo*, de forma dose-dependente, a inibição da angiogênese utilizando o modelo de angiogênese induzida por bFGF em matrigel. Também demonstraram efeitos anti-proliferativos em células endoteliais humanas (HMEC-1) e de melanoma murino (B16F10). Montenegro e colaboradores (2012) para elucidar os mecanismos de anti-proliferativos de DisBa-01, demonstraram *in vitro* que, DisBa-01 inibe significativamente a expressão de VEGF e seus receptores em células endoteliais induzido por TNF- α (HMEC-1).

Conforme Ramos e colaboradores (2008), DisBa-01 apresenta maior afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$. Esta integrina desempenha um papel complexo na regulação da angiogênese. Os vasos sanguíneos em estado de quiescência expressam baixos níveis de $\alpha_v\beta_3$, entretanto, durante a angiogênese, as células endoteliais passam a expressar elevados níveis dessa integrina. Com base nessas observações, $\alpha_v\beta_3$ foi considerada como uma integrina promotora

da angiogênese (ELICEIRI, 2000). Além disso, $\alpha_v\beta_3$ pode regular eventos de sinalização celular que, isoladamente ou combinado a sinais mediados por receptores de fatores de crescimento, promovem a migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação das células endoteliais (CONTOIS, 2009; RUEGG, 2003). Os animais *Knockout* para este receptor não chegam a se desenvolver por apresentarem extensas regiões de hemorragias, demonstrando a importância desta integrina na função vascular (SOMANATH, 2009).

A utilização de antagonistas anti- $\alpha_v\beta_3$ tem demonstrado efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas pró-angiogênicas como o VEGF e o FGF (GOEL, 2013). Além disso, o bloqueio de receptores integrina pode interferir na sinalização de outros receptores relacionados às citocinas. Esses efeitos são mais conhecidos em receptores tirosina-cinases (RTQ). As integrinas parecem cooperar com RTQ e assim regular as vias de sinalização para proliferação e sobrevivência celular. A cooperação entre $\alpha_v\beta_3$ e o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR) no microambiente tumoral é a mais estudada (SOUNG et al. 2010; STREULI et al. 2009).

Desse modo, a inibição significativa da angiogênese com DisBa-01, em parte, pode ser explicada pelo papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células endoteliais e sua cooperação com o FGFR e VEGFR. Assim, o bloqueio da $\alpha_v\beta_3$ durante a angiogênese interfere na sinalização de VEGF e FGF, inibindo o processo angiogênico.

A resolução da inflamação é direcionada pela *downregulation* de mediadores pró-inflamatórios, a reconstituição da permeabilidade microvascular ao normal, a qual irá contribuir para cessar as quimiocinas locais, a síntese de mediadores anti-inflamatórios, bem como a apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório. Uma resposta inflamatória tecidual de sucesso requer a expressão coordenada de fatores envolvidos no processo de resolução da inflamação (EMING, et al 2007; SERHAN, et al 2013).

Durante o processo de resolução da inflamação os macrófagos secretam grandes quantidades de TGF- β . Esta citocina induz a diferenciação de fibroblastos, estimula a deposição de colágeno e a apoptose de neutrófilos (REINKE, 2012). O remodelamento da MEC sob circunstâncias normais, encontra-se em equilíbrio, devido ao balanço entre a deposição e a degradação de componentes da matriz. Esses eventos são controlados, principalmente, pelas ações de TGF- β sobre os componentes celulares. Embora TGF- β seja importante em situações fisiológicas, também está associado em situações patológicas, como as fibroses teciduais, comum em doenças inflamatórias crônicas (BIELEFELD, 2012).

O tratamento com DisBa-01, não promoveu alterações significativas no processo de reparo. A concentração de TGF- β , bem como a deposição de colágeno não foram alteradas por DisBa-01.

Curiosamente, as ações anti-inflamatórias de DisBa-01 parecem ser independentes da atuação do TGF- β , uma citocina pró-resolutiva. Outro aspecto interessante do trabalho, do ponto de vista clínico, é que DisBA-01 age sobre componentes da resposta inflamatória/angiogênica, sem interferir na deposição de colágeno.

Esse trabalho é o primeiro a mostrar os efeitos da DisBa-01 em um modelo que possibilitou avaliar componentes importantes e que ocorrem concomitantemente durante o desenvolvimento de uma série de patologias que acometem a população mundial como as doenças inflamatórias crônicas e os cânceres. Além de revelar um efeito anti-inflamatório importante da DisBa-01 o qual ainda não havia sido estudado, ampliando a gama de efeitos desta desintegrina.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com DisBa-01 inibe vários componentes do tecido fibrovascular (angiogênese, infiltrado de neutrófilos/macrófagos e citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas);
- O tratamento utilizado foi eficaz em mostrar efeitos diferenciais da DisBa-01 em compostos da angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos;
- O mecanismo de ação da DisBa-01 na inibição da inflamação e angiogênese foi pelo menos, em parte, mediado pelas citocinas VEGF, FGF, TNF- α , CXCL-1 e CCL-2;
- A DisBa-01 exerce efeitos antiinflamatórios e antiangiogênicos sem alterar a deposição de colágeno;
- As funções da DisBa-01 nos múltiplos parâmetros dos componentes da angiogênese inflamatória reveladas neste estudo prevê evidências adicionais e inovadoras do potencial terapêutico do composto.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, SS. et. al. Brucine, a plant derived alkaloide inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Biomedicine e preventive nutrition**, v.1, n.1, p.180-1851, 2011.

ALBER, A. et al. The role of macrophages in healing the wounded lung. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p.243-251, 2012.

ALLAVENA, P. Chemokines in cancer related inflammation. **Experimental Cell Research**, v.307, n.5, p.664-673, 2011.

ALON, R. Cells on the run: Shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v.20, n.5, p. 525-532; 2008.

ANDRADE, SP. et al. Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. **International Journal of Experimental Pathology**, vol.74, n.4, p. 503-513, 1992.

ANDRADE, SP. et. al. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Journal of Experimental Pathology**, v.68, n.6, p.755-766, 1987.

ARAUJO, FA. et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. **Biomedicine & Pharmacoterapy**, v.64, n.1, p.29-34, 2010.

ARAUJO, FA. et al. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.34, n.4, p. 262-268, 2011.

ARROYO, AG.; IRUELA-ARISPE, ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular research**, vol.86, n.2, p. 226-235; 2010.

BAILEY,PJ. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**, v.162, p. 327-334, 1988.

BAKLWILL, F.; MANTOVANI,A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? **Lancet**, v.127, n. 9255, p.539-545, 2001.

BALLKWILL, F.; MANTOVANI, A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.87, n.4, p.401-406, 2010.

BARCELOS, LS. et al. Role of the chemokines CCL3/MIP-1 α and CCL5/ RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. **Microvascular Research**, v.78, n.2., p.148-154, 2009.

BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBEG,D. Integrins. **Cell Tissue Research**, v.339, n.1, p.269-280, 2010.

BIELEFELD, KA. et al. Cutaneous wound healing:recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n.2, p. 2059-2081, 2013.

BLEDZKA, K.; SMYTH, SS.; PLOW, EF. Integrin α II β 3 – From Discovery to efficacious therapeutic target. **Circulation Research**, vol. 112, n. 8, p.1189-1200, 2013.

BORBYSHEV, TV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. **Micron**, v.37, n.3, p.208-222, 2006.

BOUVARD, D. et al. Integrin inactivators: balancing cellular function in vitro and in vivo. **Nature**, v.14, n.7, p.430-442, 2013.

BRADLEY, PP. et al. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil contente with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v.78, n.3, p.206-209, 1982.

BURG, N.; PILLINGER,MH. The neutrophil: Function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, v.99, n.1, p.7-17, 2001.

BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced pertubations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1845, n.2, 2014.

CALVETE, JJ. The continuing saga of snake venom disintegrin. **Toxicon**, vol. 62, p. 40-49, 2013.

CAMPOS, et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, v. 21, p. 1263-1270, 2006.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature**, v.6, n.4, p.389-395, 2000.

CASTRO, PR.et. al. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. **Microvascular Research**, v.84, n.1, p.9-15, 2012.

CHU, Wen-Ming. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v.328, n2, p.222-225, 2013.

CHUNG, Ching-Hu. et al. The integrin $\alpha 2\beta 1$ agonist, aggretin, promotes proliferation and migration of VSMC through NF- κ B translocation and PDGF production. **British Journal of Pharmacology**, v.158, n.2, p.846-856, 2009.

COELHO, A.L.; et al. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Experimental Cell Research**, v.251, n.2, p. 379-387, 1999.

CONTOIS, L.; AKALU, A.; BROOKS, PC. Integrins as functional hubs in the regulation of pathological angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v.19, n.5, p. 318-328, 2009.

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

COUSSENS, LM.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, n.6917, p.19-26, 2002.

DANHIER, F.; BRETON, AL.; PRÉAT, V. RGD-based Strategies to Target Alpha (v) Beta (3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n.11, p. 2961-73, 2012.

ELICEIRI, BP. Integrin and Growth factor receptor crosstalk. **Circulation Research**, v.89, n.12, p. 1104-1110, 2001.

ELICEIRI, BP. Role alpha V integrins during angiogenesis. **Cancer Journal**, v.4, n.12, p.45-49, 2000.

EMING, SA. et al. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, n.3, p.514-525, 2007.

FENWICK, AM. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (serpents: Viripidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 153, n.3, p.617-640, 2009.

FERFUSON, LR. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutation Research**, v.690, n.1-2, p. 3-11, 2010.

FOLKMAN, J. Is Angiogenesis in organizing principle in biology and medicine?. **Journal of Pediatric Surgery**, v.42, n.1, p.1-11, 2007.

GEWINS, P. et al. Function of fibroblast growth factor and vascular growth factor and their receptors in angiogenesis. **Hematology**, v. 34, n. 3, p.185-194, 2000.

GOEL, HL.; MERCÚRIO, AM. VEGF targets the tumor cell. **Nature Reviews**, vol.13, p.871-882, 2013.

GRINDLAY, JH.; WAUGH, JM. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. **AMA Archives Surgery**, v.63, n.3, p.288-297, 1951.

GROOT, H. et al. Angiostatic and angiogenic factor. **Developments in Ophthalmology**, v.46, p.1-3, 2010.

HASKÓ, G. PACHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p.865-869, 2012.

HERTER, JM. et al. Integrin activation by P-rex1 is required for selectin-mediated slow leukocyte rolling and intravascular crawling. **Blood**, v. 121, n. 12, p.2301-2310, 2013.

HSU. CC. et al. Improvements in endotoxemic syndromes using a disintegrin, rhodostomin, through integrin $\alpha_v\beta_3$ -dependent pathway. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, n.2, p.593-602, 2010.

HU, DE. et al. Correlation of ^{133}XE clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies angiogenic modifiers. **Laboratory Investigation**, v.72, n.5, p. 601-10, 1995.

JANG, Yoon-Jung. et al. Saxatilin suppresses tumor-induced angiogenesis by regulation VEGF expression in NCI-H460 human lung cancer cells. **BMB Reports**, v.40, n.3, p.439-443, 2007.

JERKE, U. et al. β_2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.18, p. 12910-12919, 2013.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature**, v.13, n.3, p.159-175, 2013.

LAUDANNA, C.; ALON, R. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. **Vascular Cell Signalling**. v.95, n.1, p. 5-11, 2006.

LEE, HS. Src tyrosine kinases mediate activations of NF- κ B and integrin signal during lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Journal of Immunology**, v.179, n.10, p.7001-7011, 2007.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.10, p.790-802, 2003.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: The Leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v.7, n.9, p.678-689, 2007.

LI, M. et al. An essential role of the NfF- κ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. **The Journal of Immunology**, v.166, n.12, p.7128-7135, 2001.

LIN, TH. et al. D-pinitol inhibits prostate cancer metastasis through inhibition of α v β 3 integrin by modulating FAK, c-SRC and NF- κ B pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.5, p. 9790-9802; 2013.

LIU, G.; YANG, H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. **Journal of Cellular Physiology**. v. 288, n.3, p. 502-512, 2013.

LIU-ST et al. Src as the link between inflammation and cancer. **Frontiers in Physiology**, v.416, n.4, p.1-6, 2014.

LOWIN, T; STRAUB,R. Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.13, n.5, p.13-15, 2011.

MADGE, LA.; POBER, JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 70, n.3, p. 317-325, 2001.

MALININ, NL.; PLUSKOTA, E.; BYZOVA, TV. Integrin signaling in vascular function. **Current Opinion in Hematology**, v.19, n.3, p. 206-211, 2012.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance and diversity. **Current Opinion in Immunology**. p.231-237; 2010.

MARELLI, UK. et al. Tumor Targeting via Integrin Ligands. **Frontiers in Oncology**, v.333, n.3, p. 3-222, 2013

MARIANO-OLIVEIRA, A.; et al. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **European Journal of Biochemistry**, v.270, n.24, p. 4799–4808, 2003.

MARQUES, SM. et al. Genetic Background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular Research**, v.82, n.3, p. 246-252; 2011

MATSUI, T.; HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1075-1087, 2005.

MEDZHITOY, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p.428-435, 2008.

MEDZHITOY.R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n.6, p.771-776, 2010.

MENDES, JB. et al. Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. **Life Sciences**, v. 84, n.15-16, p.537-543, 2009.

MEYER, A. et al. Targeting RGD recognizing Integrins: Drug development, Biomaterial research, tumor imaging and targeting. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, n.22, p.2723-2743; 2006.

MÓCSAI, A. Diverse novel function of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **The Journal of Experimental Medicine**, v.210, n.7, p.1283-1299, 2013.

MONTENEGRO, CF. et al. Blocking avb3 Integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v.94, n.8, p.1812-1820, 2012

NATHAN, C. et al. Neutrophil Activation on Biological Surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.80, n.6, p.1150-1560, 1987.

OLFA, Kalech-Ziri.; et al. Lebestatin, a disintegrin from Macrovipera venom, inhibits integrin -mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v.85, n.12, p.1507-1516, 2005.

ORTEGA-GOMEZ, A.; PERETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **Molecular Medicine**, v.5, n.5, p.661-674, 2013.

PAOLILLO, M. et al. Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, n.12, p. 1439-1446, 2009

PEDERSEN, L. et al. Exercise -induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression. **The Journal of Physiology**, v.589, n.12, p. 1409-1420, 2011.

PHILLIPS, CL et al. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney International**, v.62, n.2, p. 383-391, 2002.

PICK, R. et al. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. **Molecular Immunology**, v.55, n.1, p.70-75, 2013.

PLUNKETT, ML.; HAILEY, JA. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory Investigation**, v.62, n.4, p.510-517, 1990.

RAMJAUN, AR.; HODIVALA-DILKE,K. The role cell adhesion pathways in angiogenesis. **The International of Biochemistry & Cell Biology**, v.43, n.3, p.521-530, 2009.

RAMOS, OHP. et al. A novel avb3-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical Experimental Metastasis**, v.25, n.1, p.53-64; 2008

RAMOS, OHP.; SELISTRE-DE-ARAUJO, HS. Snake Venom metalloproteases – Structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Biochemistry and Physiology**, v.143, n.1-4, p.329, 2006.

REINKE, JM.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v.22, n.1, p. 35-43, 2012.

REN, L. et al. The roles of inflammatory cytokines in the pathogenesis of ossification of ligamentum flavum. **American Journal of Translational Research**, v.5, n.6, p.582-585, 2013.

RIBATTI, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. **Angiogenesis**, v.11, n.1, p.3-11, 2008.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. "Sprouting angiogenesis" a reappraisal. **Development Biology**, v.372, n.2, p.157-165, 2012.

ROCHA, MMT; FURTADO, MFD. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* em função da distribuição geográfica no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.2, p.383-390, 2005.

RUBIO-PEREZ.J.; MORILLAS-RUIZ, JM. A review: Inflammatory process in Alzheimer's Disease, role of Cytokines. **The Scientific World. Journal**, p.1-15, 2012.

RUEGG, C.; DORMOND, O.; MARIOTTI, A. Endothelial Cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1654, n.1, p. 51-67, 2003.

SAEGUSA, J. et al. Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins avb3 and a4b1 and induces proliferation of monocytic cells in integrin-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.38, p. 2617-26115, 2008.

SARASWATI, S. et. al. Boswellic acid inhibits inflammatory angiogenesis in murine sponge model. **Microvascular Research**, v.82, n.3, p.263-268, 2011.

SARASWATI, S.; AGARWAL, SS. Strychnine inhibits inflammatory angiogenesis in mice via down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β . **Microvascular Research**, v.87, p.7-13, 2013.

SCHETT, G. et al. How cytokine networks fuel inflammation. **Nature Medicine**, v.19, p. 822-824, 2013.

SELISTRE-DE-ARAUJO, HS. Et al. Snake Venom disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.2, n.11, p. 2606-2601; 2010.

SENGER, DR.; DAVIS, GE. Angiogenesis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.1-18; 2011

SHEEN, YY. et al. Targeting the transforming growth factor- β signaling in cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, n.1, p.323-331, 2013.

SERHAN, CN. et al. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Review Immunology**. V.8, n.5, p. 349-361, 2008.

SILVA, S. et. al. Integrins: The keys to unlocking angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, n.10, p. 1703-1713, 2008.

BARRIER, AL.; YAMADA, KM. Cell-matrix adhesion. **Journal of Cellular Physiology**, p.565, 2007

SOMANATH, PR.; CIOCEA, A.; BYZOVA, TV. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. **Cell Biochemistry and Biophysics**, n.53, v.2, p.53-64, 2009.

SONG, YH.; CLIFFORD, JL.; CHUNG, J. Crosstalk between integrin and receptors tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. **BMB Reports**, v.43, n.5, p. 311-318, 2010.

STREULI, CH; AKHTAR, N. Signal co-operation between integrins and other receptor system. **The Biochemical Journal**, v.418, n.3, p.491-506, 2009.

SZEKANEZ, Z.; KOCH, AE. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v.30, n.1, p. 97-114, 2004.

MUNDEL, TM.; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. **Microvascular Research**, p.86. 2007

TAKADA, Y. et al. The integrins. **Genome Biology**, v.8, n.5, p.8-25, 2007.

TSENG, YL; PENG, HC; HUNG. et al. Rhodostomin, a disintegrin, inhibits adhesion of neutrophils to fibrinogen and attenuates superoxide production. **Journal of Biomedical Sciences**, v.11, n.5, p. 683-691. 2004

VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, n.26, p.3831-3852, 2012.

VESTWEBER, D. Endothelial cell contacts in inflammation and angiogenesis. **International Congress Series**, v.1312, p.17-25, 2007.

WECKBACH, et al. The cytokine midkine supports neutrophil traffick during acute inflammation by promoting adhesion via β_2 integrins (CD11/CD18). **Blood**; 2014.

WHITE, ES.; MANTOVANI, AR. Inflammation, wound repair and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. **Journal of Patology**, v. 229, n. 2, p.141-144, 2013.

WILSON, PM.; LABONE, MJ.; LENZ, Heinz-Josef. Assessing the in vivo efficacy biologic antiangiogenic therapies. **Cancer Chemotherapy Pharmacoloy**, v.71, n.1, p.1-12, 2013.

WOLFENSON, H.; LAVELIN, I.; GEIGER, B. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. **Cell**, v.24, n.5, p.447-457, 2013.

XAVIER, DO. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.64, n.3, p. 220-225, 2010.

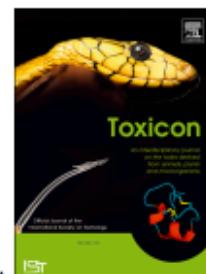
YAN, LI. Molecular targeted agents-Where we are and where we are going. **Chinese Journal of Cancer**, v.32, n.5, p.225-232, 2013.

ZARBOCK, A; et al. Leukocyte integrin activation and deactivation: Novel mechanisms of balancing inflammation. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v.90, n.4, p. 353-359, 2012.

ZHANG, XW. et al. CXC chemokine, MIP-2 and KC, induced P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v.133, n.3, p.413-421, 2001.

ANEXO A – Aceitação e publicação do artigo na revista Toxicon

Accepted Manuscript



DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice

Puebla Cassini-Vieira, Simone Ramos Deconte, Tatiana Carla Tomiosso, Paula Peixoto Campos, Cyntia de Freitas Montenegro, Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araújo, Lucíola Silva Barcelos, Silvia Passos Andrade, Fernanda de Assis Araújo

PII: S0041-0101(14)00338-9

DOI: [10.1016/j.toxicon.2014.10.007](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007)

Reference: TOXCON 4942

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 8 August 2014

Revised Date: 30 September 2014

Accepted Date: 7 October 2014

Please cite this article as: Cassini-Vieira, P., Deconte, S.R., Tomiosso, T.C., Campos, P.P., de Freitas Montenegro, C., Selistre-de-Araújo, H.S., Barcelos, L.S., Andrade, S.P., Araújo, F.d.A., DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice, *Toxicon* (2014), doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.007.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.