

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

BRUNO ANTONIO FERREIRA

Avaliação da atividade da Jararagina-C na resposta inflamatória
induzida por implantes de esponja em camundongos.

Uberlândia
2016

BRUNO ANTONIO FERREIRA

**Avaliação da atividade da Jararagina-C na resposta inflamatória
induzida por implantes de esponja em camundongos**

Dissertação apresentado 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 em Biologia Celular

Orientador: Prof.^a Dr.^a Fernanda de Assis Araújo
Co-orientador: Dr.^a Patrícia Bianca Clissa

Uberlândia
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383a

2016

Ferreira, Bruno Antonio, 1990

Avaliação da atividade da Jararagina-C na resposta inflamatória induzida por implantes de esponja em camundongos / Bruno Antonio Ferreira. - 2016.

65 f. : il.

Orientadora: Fernanda de Assis Araújo.

Coorientadora: Patrícia Bianca Clissa.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.772>

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Citocinas - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Quimiocinas - Teses. I. Araújo, Fernanda de Assis. II. Clissa, Patrícia Bianca. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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 ACADÉMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 001/2016 do PPGBC

Data: 28 de Abril de 2016

Discente: Bruno Antônio Ferreira

Matrícula nº 11412BCE001

Título do Trabalho: "Avaliação da atividade da Jararagina-C na resposta inflamatória induzida por implantes de esponja em camundongos"

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

Projeto de Pesquisa vinculado: -----

Às nove horas do dia vinte e oito de abril do ano de 2016 no Laboratório de práticas virtuais, Bloco 2A, 1º andar - 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: Professores Doutores: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila - UFU; João Henrique Ghilardi Lago – UNIFESP e Fernanda de Assis Araújo, orientadora do candidato. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo - apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que 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 Bruno Antônio Ferreira aprovado. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho:

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 horas e 20 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Veridiana Melo
Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
UFU

João Ghilardi
Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
UNIFESP

Fernanda
Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo - Orientadora
UFU

Dedico este trabalho à professora Fernanda, orientadora
e amiga, e aos meus pais Ari Fernando e Edimari,
por todo o esforço e compromisso com a minha formação.

“Nunca se afaste de seus sonhos. Porque se eles forem,
você continuara vivendo, mas terá deixado de existir.”
-Mark Twain

AGRADECIMENTOS

Este, assim como tantos outros trabalhos que desenvolvemos em nossas vidas, não se trata de uma conquista individual, mas sim do esforço de um coletivo, no qual cada parte contribui com o seu melhor para mais uma vitória. Então, após estes dois anos de dedicação, venho por meio de algumas palavras tentar expressar todo o carinho que sinto por aqueles que tanto me ajudaram e ainda ajudam, e a gratidão por todos que abraçaram este sonho.

À Professora, orientadora e amiga Fernanda. Gostaria de agradecer a oportunidade de continuar meus estudos, pela paciência, principalmente com meus atrasos, que sempre teve durante esta jornada, pelo companheirismo em horas difíceis, pelo comprometimento com este e todos os outros trabalhos que desenvolve e pelo modo justo, sincero e espontâneo com que leva a vida. Fernanda, saiba que te admiro não apenas pela profissional que você é, mas também pela pessoa que tive a oportunidade de conhecer.

Aos meus pais Ari Fernando e Edimari, pelo amor e carinho com que me criaram, pela luta constante para que eu realize todos os meus sonhos, pelos ensinamentos e pela compreensão em todos os momentos de ausência. Papai e mamãe este momento é nosso, em cada palavra aqui escrita saibam que existe um pouco de cada um de vocês.

Ao meu irmão Igor, pelo companheirismo e apoio incondicional de alguém que cresci ao lado e até hoje tenho esta oportunidade.

À Dr.^a Patrícia Bianca Clissa por ter investido nesta parceria, cedendo a Jararagina-C e desprendendo de seu tempo para corrigir e auxiliar nesta dissertação.

À Simone, uma grande amiga que fiz nesta jornada, agradeço por tudo, de coração, desde as conversas em rodas de bar até as broncas por eu não ter anotado algo que você tanto pedia. Si, obrigado pela paciência, pelo profissionalismo e amizade.

Aos meus amigos de bancada Anderson, Natália, Ricardo e Luís Fernando, obrigado por compartilharem tantos momentos ao meu lado, por cada risada, por cada choro, por cada sonho, por cada expectativa e por cada frustração, tenho certeza que tudo que passamos nos fez mais fortes.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas com quem tive a oportunidade de aprender ainda mais sobre este campo da biologia. Em especial à professora Tatiana Carla Tomiosso pelo carinho e amizade nesta jornada.

Aos funcionários da ARFIS, pela gentileza e serviços prestados. Em especial à Cristiane (Cris), amiga desde o primeiro período da graduação e psicóloga pessoal, com quem compartilho praticamente todos os meus problemas. “Cris o que seria desse 2A sem você?

Ao Leonardo, sei que só um obrigado é pouco para você que sacrificou dias e noites ao meu lado, que acompanhou pelo menos metade de toda essa história, que esteve ao meu lado desde o primeiro momento em que entrou na minha vida, que muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesmo, que tem me acompanhado em todos os momentos felizes e tristes desde então. Agradeço imensamente por abraçar os meus sonhos e por me permitir estar ao seu lado. Agradeço também a sua família por me acolherem tão bem em todos os momentos.

À Lívia, agradeço do fundo do coração a nossa amizade, obrigado por toda sua torcida e de sua família para o meu sucesso, obrigado por cada velinha que sua mãe acendeu pelas minhas conquistas. Posso dizer que você é o reflexo perfeito de uma criação cheia de amor.

Finalmente, agradeço aos meus amigos, essenciais em minha vida, muitos dos quais levo como família em Uberlândia, irmãos de diferentes mães e pais, cada um com seus defeitos e qualidades que os tornam únicos para mim. Obrigado por estarem ao meu lado, por estenderem as mãos sempre que eu precisei, por cada sorriso e por cada lágrima compartilhada, amo todos vocês.

RESUMO

A inflamação e a angiogênese atuam concomitantemente em diversas doenças crônicas. Muitos destes processos são mediados através da interação entre a matriz extracelular e receptores transmembrana da família das integrinas. A Jararagina-C (Jar-C) é uma proteína tipo desintegrina, isolada à partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Estudos com esta molécula mostraram seus efeitos sobre adesão celular mediada por colágeno tipo I e a capacidade de modular via integrina $\alpha_2\beta_1$ diversos aspectos da atividade celular. Nosso objetivo foi investigar os efeitos da Jararagina-C em componentes chaves da resposta inflamatória induzida por modelo de implantes sintéticos de esponja em camundongos. O tratamento com JAR-C foi capaz de amplificar a resposta inflamatória alterando em determinadas doses os principais componentes do tecido fibrovascular induzido pelos implantes sintéticos subcutâneos, modulando também a fibrogênese. Os efeitos pró-inflamatórios foram observados através do aumento da atividade enzimática de neutrófilos e macrófagos (MPO e NAG, respectivamente), bem como pela maior produção das quimiocinas CXCL-1/KC e CCL2-JE-MCP,1 envolvidas com o recrutamento destes tipos celulares, bem como pela maior produção da citocina TNF- α . Quanto ao componente angiogênico foram realizadas a dosagem do conteúdo de hemoglobina, a contagem de vasos, e a concentração da citocina VEGF, onde apenas este último parâmetro apresentou diferenças quanto em relação ao grupo controle. Os efeitos da Jararagina-C sobre a fibrogênese tecidual foram avaliados pela dosagem de colágeno solúvel total, através de técnicas histológicas e pela concentração da citocina TGF- β , sendo observado um aumento na deposição de colágeno de maneira independente à produção de TGF- β . Todos esses fatores demonstram a capacidade da Jararagina-C em modular componentes da resposta inflamatória crônica, bem como os eventos associados a este processo.

Palavras-chave: Inflamação, Jararagina-C, Desintegrinas, Citocinas, Quimiocinas, Implantes

ABSTRACT

Inflammation and angiogenesis act simultaneously on various chronic diseases. Many of these processes are mediated by interaction between extracellular matrix and integrin transmembrane receptors. The jararhagin-C (Jar-C) is a *disintegrin-like* protein, isolated from the venom of the viper *Bothrops jararaca*. Studies showed its effects on cell adhesion mediated by type I collagen and the capacity to modulate various aspects of cellular activity by association with integrin $\alpha_2\beta_1$. Our objective was to investigate the effects of jararhagin-C on key components of the inflammatory response induced by a model of synthetic implants sponge in mice. The treatment with JAR-C was capable of amplifying the inflammatory response changing at certain doses some major components of fibrovascular tissue induced by subcutaneous synthetic implants also modulating fibrogenesis. The proinflammatory effects were observed by increasing the enzyme activity of neutrophils and macrophages (MPO and NAG, respectively), as well as the increased production of chemokines CXCL-1 / KC and CCL2-JE-MCP 1 involved in the recruitment of these cell types as well as by the increased production of TNF- α cytokine. As for the angiogenic component, were carried out the dosage of hemoglobin content, the vessel count, and the concentration of VEGF cytokine, where only the latter parameter showed differences as compared to the control group. The effects of jararhagin-C on tissue fibrogenesis were assessed by dosage of soluble collagen, by histological techniques and the concentration of TGF- β cytokine, we observed an increase in collagen deposition independently of TGF- β . All these factors demonstrate the ability of jararhagin-C to modulate some components of the chronic inflammatory response, as well as events associated with this process.

Keywords: Inflammation, jararhagin-C, Disintegrins, Cytokines, Chemokines, Implants

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2/JE/MCP-1	Quimiocina CC ligante 2/ Proteína quimiotática para o monócito – 1 (MCP-1)
CXC	Grupo de quimiocinas com uma cisteína entre os dois resíduos aminoterminais
CXCL-1/KC	Quimiocina motivo CXC ligante 1 / Quimiocina derivada de queratinócio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked ImmunoSobrent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
FAK	Quinase de adesão focal (Focal adhesion kinase)
H.E.	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hb	Hemoglobina
HTAB	Hexadecil trimetil brometo de amônio
HUVEC	Células endoteliais humanas de cordão umbilical
ICAM	Membro da superfamília de imunoglobulinas
IL	Interleucina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Enzima Mieloperoxidase
NAG	N-acetyl-β-D-glucosaminidase
nM	NanoMolar
Nm	NanoMetro
O.D	Densidade óptica
r.p.m	Rotações por minuto
SVMP	Metaloproteinase do veneno de serpentes
TGF-β	Fator de crescimento transformante
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Recrutamento dos leucócitos para o sítio inflamatório.....	16
Figura 2	Interações celulares durante a resposta inflamatória	18
Figura 3	Passos da angiogênese em direção ao estímulo inflamatório	20
Figura 4	Representação esquemática da molécula da Jararagina	24
Figura 5	Diagrama esquemático entre os sítios ativos presentes nas desintegrinas da peçonha de serpentes (sequência de tripeptídeos) e as integrinas humanas	25
Gráfico 1	Efeito do tratamento com a Jar-C sobre o peso úmido total dos implantes sintéticos subcutâneos em camundongos	36
Gráfico 2	Efeito do tratamento com a Jar-C na atividade enzimática da enzima mieloperoxidase	36
Gráfico 3	Efeito do tratamento com a Jar-C na concentração da quimiocina CXCL-1/KC	36
Gráfico 4	Efeito do tratamento com a Jar-C na avaliação da atividade da enzima N-acetyl- β -D-glicosaminidase (NAG)	37
Gráfico 5	Efeito do tratamento com Jar-C na concentração da quimiocina CCL-2/JE/MCP-1	37
Gráfico 6	Efeito do tratamento com Jar-C na concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α	38
Gráfico 7:	Efeito do tratamento com Jararagina-C no conteúdo de hemoglobina	39
Gráfico 8:	Número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos	40
Gráfico 9:	Efeito do tratamento com a Jararagina-C na concentração de VEGF nos implantes sintéticos	40
Figura 6:	Cortes histológicos do tecido fibrovascular (corados com HE)	41
Gráfico 10:	Efeito da Jararagina-C na concentração de colágeno solúvel total nos implantes subcutâneos.	42
Gráfico 11:	Efeitos da Jararagina-C sobre a deposição de colágeno total nos implantes subcutâneos	43
Gráfico 12:	Efeitos do tratamento com a Jararagina-C sobre a concentração de TGF- β 1 nos implantes subcutâneos.	43
Figura 7:	Cortes histológicos (5 μ m, coloração picrosirius).	44

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1 – Inflamação.....	14
1.2 – Jararagina-C (Jar-C), desintegrinas e a peçonha de serpentes.	23
1.3 – Implantes sintéticos (modelo experimental)	27

2. Objetivos

2.1 – Objetivos geral	28
2.2 – Objetivos específicos	28

3. Material e Métodos

3.1 – Obtenção da peçonha	29
3.2 – Animais.....	29
3.3 – Procedimento Cirúrgico, técnica de implantação	29
3.4 – Regime de tratamento com a JAR-C	30
3.5 - Remoção dos implantes.....	30
3.6 - Dosagem de hemoglobina (avaliação indireta da neovascularização)	30
3.7 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	31
3.8 - Avaliação da atividade de NAG.....	31
3.9 - Dosagem de citocinas e quimiocinas	32
3.10 - Avaliação da deposição de colágeno solúvel	33
3.11 - Análise histológica das matrizes esponjosas	34
3.12 – Análises estatísticas	34

4. Resultados

4.1 - Efeito da Jar-C sobre o infiltrado fibrovascular no implante de esponja.....	35
4.2 - Efeito da Jar-C sobre componentes do infiltrado inflamatório	35
4.3 - Efeitos da Jararagina-C na angiogênese	39
4.4 - Efeito da Jararagina-C sobre a deposição de colágeno.....	42

5. Discussão	45
---------------------------	----

6. Conclusões	52
----------------------------	----

7. Referencial Bibliográfico.....	53
--	----

Anexos

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiopatológica disparada por algum tipo de estímulo nocivo, tal como uma infecção ou um dano tecidual, cujo principal objetivo é neutralizar o agente causador, reestabelecendo a homeostasia celular (SOEHNLEIN & LINDBOM, 2010). O controle adequado desse processo é, portanto, uma etapa essencial para que o hospedeiro desempenhe adequadamente uma resposta imune capaz de eliminar o estímulo lesivo e reparar o tecido danificado. Por atuar como uma primeira linha de defesa do organismo a inflamação tem sido considerada como parte da resposta imune inata do hospedeiro, tendo como principais células imunes envolvidas os macrófagos, as células dendríticas, os mastócitos, os neutrófilos e os linfócitos (MEDZITHOV 2008).

De um modo geral, uma resposta inflamatória é constituída por indutores inflamatórios, sensores de detecção, mediadores inflamatórios e o tecido alvo, além disso, dependendo da natureza do estímulo nocivo inicial, o desenvolvimento do processo inflamatório pode apresentar diferenças no decorrer do seu percurso (MEDZHITOY, 2010). Uma resposta inflamatória bem-sucedida resulta na eliminação do agente agressor, seguida pelas fases de resolução e de reparo tecidual (SERHAN & SEVILL, 2009).

Em um primeiro momento, células residentes teciduais, detectam o insulto lesivo através de receptores transmembrana específicos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), estes são capazes de detectar a presença de organismos infecciosos e a incidência de qualquer dano celular por meio do reconhecimento de estruturas conservadas presentes em alguns microrganismos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e através de moléculas endógenas derivadas de danos internos do organismo, padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (MEDZHITOY, 2008). Essas interações resultam em uma resposta inflamatória coordenada, que leva à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, os quais promovem alterações vasculares e eventos celulares característicos, permitindo o extravasamento através da parede do endotélio de proteínas plasmáticas e leucócitos, antes restritos à circulação (MANTOVANI et al, 2011).

As alterações vasculares observadas em decorrência de um processo inflamatório compreendem uma vasodilatação local, acarretando em um aumento do fluxo sanguíneo, e um aumento da permeabilidade vascular, levando a um influxo de leucócitos (principalmente neutrófilos) e proteínas plasmáticas para o sítio inflamatório (GALLEY & WEBSTER, 2003).

Ambos os acontecimentos são decorrentes da liberação de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e quimiocinas pelas células residentes teciduais após estas perceberem algum tipo de insulto lesivo (AHMED, 2011).

A ativação das células endoteliais dos capilares sanguíneos permite o extravasamento seletivo dos neutrófilos, enquanto previne a saída de hemácias. Essa seletividade é possível graças às ligações estabelecidas entre estes tipos celulares, envolvendo diferentes classes de receptores (integrinas e selectinas), durante a sequência de eventos que levam à transmigração destes leucócitos (Figura 1) (O'CONNOR & NICHOL, 20015). O recrutamento dos neutrófilos está associado à liberação da quimiocina CXCL-1, que direciona o movimento destes em direção ao sítio inflamatório (BURG et al., 2001).

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a responder frente um estímulo nocivo, chegando rapidamente ao local da injúria. Possui um período de vida relativamente curto, entre 24-48 horas em sua forma ativa (O'CONNOR & NICHOL, 2015). No entanto, alguns estudos mostram uma capacidade do microambiente inflamatório em regular o tempo de vida destas células pela secreção de ligantes a receptores de morte celular como FAS-*ligand* e TNF, estes em baixas concentrações promovem a sobrevivência dos neutrófilos e possuem o efeito oposto quando em concentrações mais elevadas (van der BERG et al., 2001). Esse controle sobre a sobrevivência do neutrófilo deve ser bem regulado, permitindo um tempo hábil para a eliminação do agente lesivo e posterior morte celular evitando a liberação exacerbada do conteúdo citotóxico do interior destas células, que acabam ocasionando um maior dano tecidual (KENNEDY & DELEO, 2009).

Sob condições fisiológicas, os neutrófilos agem por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, levam a destruição dos patógenos invasores. A formação de EROS é catalisada por meio da enzima mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade neste tipo celular (HUANG et al., 2016). Após desempenharem o seu papel, os neutrófilos entram em processo de apoptose, que parece ser de suma importância para a atenuação da resposta inflamatória, secretando mediadores que inibem o recrutamento de novos neutrófilos, como a Anexina-1 (Anx-A1; 37 KDa) e a lactoferrina (DALLI et al., 2008; BOURNAZOU et al., 2009). Os neutrófilos apoptóticos liberam ainda sinais celulares tipo “find me” e “eat me”, que respectivamente permitem a sua localização e identificação como alvos para a fagocitose mediada pelos macrófagos (RAVICHANDRAN, 2011).

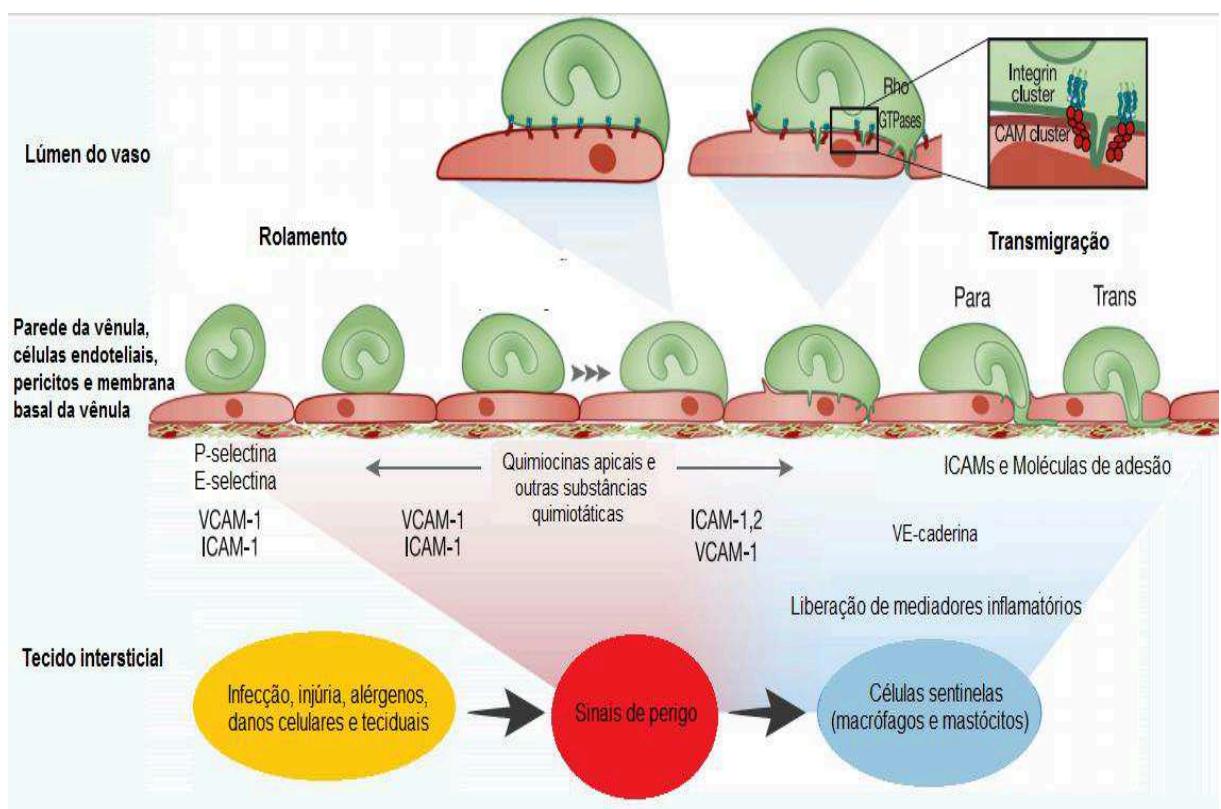


FIGURA 1 - Recrutamento dos leucócitos para o sítio inflamatório: O recrutamento dos leucócitos na direção de um estímulo nocivo tem início com a detecção deste pelas células residentes teciduais (ou células sentinelas), que passam a liberar um conjunto de mediadores pró-inflamatórios que promovem esta sequência de eventos. Moléculas de adesão expressas por células endoteliais ativadas da família das selectinas (P-selectinas e E selectinas) permitem interações fracas e transientes entre estas células e leucócitos circulantes situados na periferia dos vasos, possibilitando o rolamento destes neutrófilos pela parede do endotélio na direção de um estímulo quimiotático. Adesões mais consistentes e a transmigração através da parede endotelial, em um processo também conhecido como diapedese, são estabelecidas por moléculas de adesão celular (ICAM e VCAM) e pela interação integrinas-ligantes, respectivamente (Figura adaptada de NOURSHARGH & ALON, Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, pp. 695, 2014).

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que se originam a partir da diferenciação dos monócitos, quando estes deixam a corrente sanguínea e chegam ao sítio inflamatório (ZHANG & MOSSER, 2008). São um importante tipo celular na resposta imune inata de um organismo, além de realizarem a fagocitose de organismos invasores, corpos estranhos e debris celulares, possuem também uma alta atividade secretora, liberando inúmeros mediadores que regulam os mecanismos de defesa do hospedeiro, os processos inflamatórios e a homeostasia (LASKIN, 2009).

Estima-se que 10-15% de um tecido seja constituído por macrófagos residentes, que auxiliam na manutenção da homeostasia destes por uma variedade de mecanismos particulares aquele tecido (GORDON & TAYLOR, 2005). Quando estas células percebem

algum desbalanço dessas condições, passam a liberar um conjunto diferenciado de mediadores e fatores de crescimento, a fim de reestabelecer a normalidade no local. Caso o insulto persista, monócitos circulantes são recrutados na direção do local da resposta inflamatória pela liberação da quimiocina CCL-2/JE/MCP-1 pelas células residentes (HASKÓ & PACHER 2012).

A ativação dos macrófagos mostra-se como um processo dinâmico, as mesmas células inicialmente envolvidas nas reações citotóxicas comuns à resposta inflamatória, também podem estar presentes durante a resolução desta e no reparo tecidual (PORCHERAY et al, 2005). São caracterizados por uma diversidade e plasticidade fenotípica que permitem a estas células realizarem a fagocitose e possuírem diferentes estados de ativação, sendo agrupados nas subpopulações M1 e M2 segundo o conjunto de ações que estas comumente desempenham (SICA & MANTOVANI, 2012).

Os macrófagos da subpopulação M1, atuam principalmente nos processos de defesa, eliminando agentes lesivos através da síntese em altas concentrações da enzima lisossomal N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). Além disso, exercem efeitos anti-proliferativos e citotóxicos devido à liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias (PERES et al., 2013).

Já os macrófagos M2, estão mais envolvidos com a fase resolutiva da inflamação, fagocitando os neutrófilos apoptóticos, diminuindo a síntese e liberação de citocinas inflamatórias e aumentando a síntese de mediadores importantes no remodelamento tecidual, na angiogênese, e no reparo tecidual (LASKIN, 2009)

A fagocitose dos neutrófilos apoptóticos permite a troca do fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo anti-inflamatório, o que parece ser um pré-requisito para o egresso dessas células e reestabelecimento da homeostasia tecidual. O processo de resolução da inflamação é facilmente reconhecido por uma maior expressão de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1) e glicocorticoides (FOX et al, 2010). Os macrófagos M2 secretam grande quantidade de TGF- β 1, estimulando a deposição de colágeno, proteoglicanos e fibronectinas. Além destes, outro importante mediador é o fator de crescimento endotelial (VEGF) capaz de induzir a angiogênese necessária à fase proliferativa, permitindo a cicatrização de feridas (LIU et al.,2014).

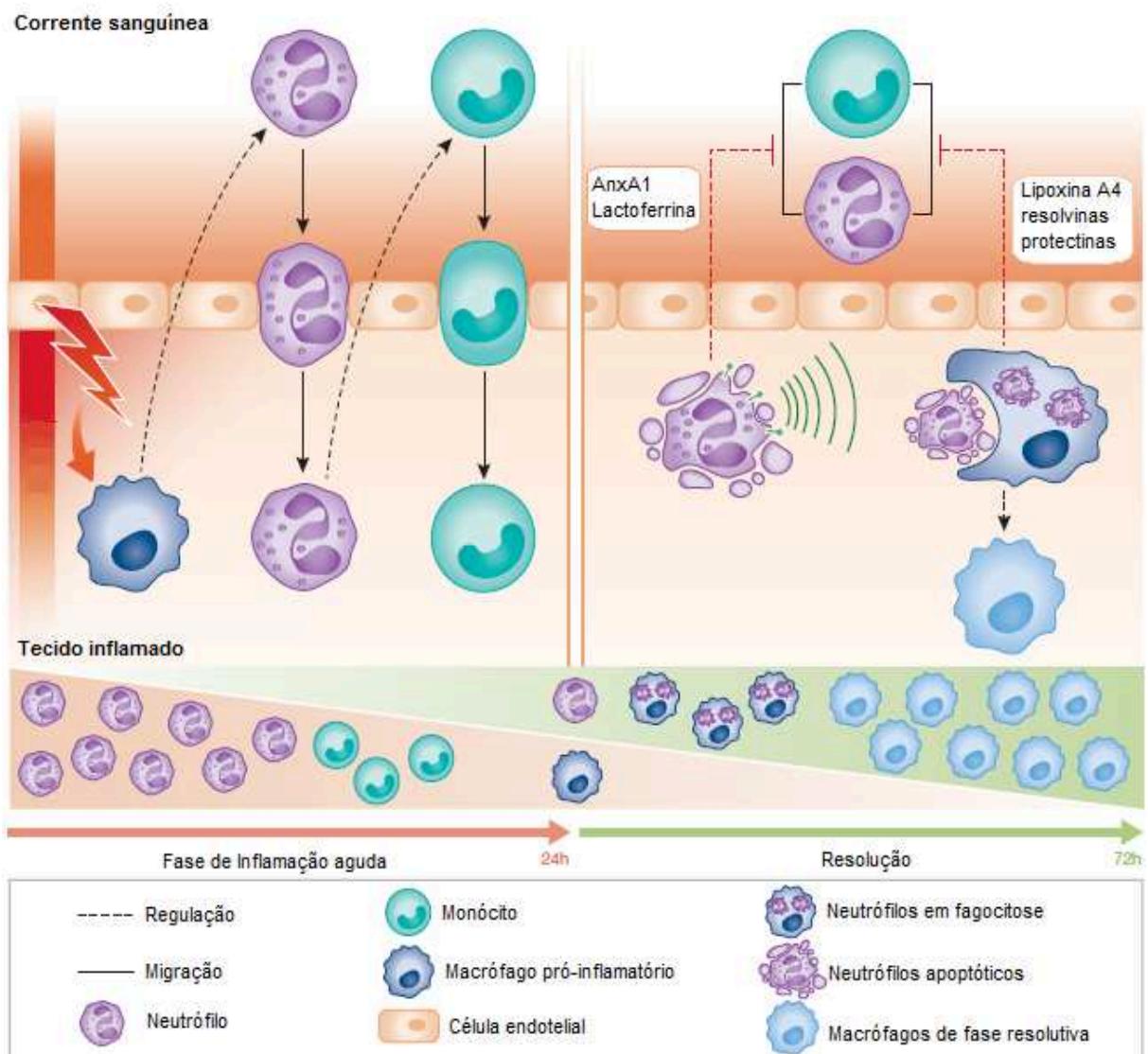


Figura 2 – Interações celulares durante a resposta inflamatória: Visão geral dos processos celulares durante o início (à esquerda) e resolução (à direita) da inflamação. Durante a fase inicial as células residentes do tecido inflamado percebem danos e iniciam a liberação de sinais que induzem a rápida migração dos neutrófilos, acompanhada por um influxo tardio de monócitos, para o sítio inflamatório. A resolução é iniciada quando os neutrófilos entram em processo de apoptose e passam a sintetizar mediadores que inibem a infiltração de novos neutrófilos. A ingestão dos corpos apoptóticos pelos macrófagos permite a troca destes para um fenótipo M2, associado com a fase de resolução da resposta inflamatória, expressando citocinas anti-inflamatórias e promovendo a homeostase do tecido. (Figura adaptada de ORTEGA-GOMEZ et al. Resolution of inflammation. EMBO Molecular Medicine, pp. 664, 2013).

Tendo a resposta inflamatória evoluído como um mecanismo de defesa do organismo frente a um estímulo lesivo, a homeostasia e a resolução da inflamação só são alcançados após a eliminação do agente nocivo. Caso esse processo falhe por algum motivo, a inflamação passa para um estágio crônico, caracterizado por um aumento de leucócitos mononucleares no local, estimulando a síntese e deposição de colágeno, assim como a angiogênese, em um processo de feedback positivo onde a célula do infiltrado inflamatório sustenta a angiogênese,

que por sua vez exacerba a resposta inflamatória. Os mecanismos que levam à cronificação da resposta inflamatória em muitas condições ainda permanece desconhecido, no entanto, a importância das condições inflamatórias crônicas não deve ser subestimada, devido ao seu envolvimento com muitas doenças, como a diabetes, a artrite reumatoide, o câncer, dentre outras (AHMED, 2010; MAZZONE, 2009).

A angiogênese e a inflamação são processos distintos, que podem ocorrer independentemente ou concomitantemente. A resposta angiogênica é capaz de estimular e intensificar o processo inflamatório, fornecendo nutrientes e oxigênio para os sítios da inflamação. Da mesma maneira, os processos inflamatórios induzem a ativação endotelial e aumentam a permeabilidade vascular, através da liberação de citocinas e quimiocinas pelas células que compõem o quadro inflamatório (ARROYO & IRUELA-ARISPE, 2010; NEVE et al., 2014).

Trata-se de um processo biológico de formação de novos capilares sanguíneos a partir de outros pré-existentes. Fisiologicamente, em indivíduos adultos, ocorre durante o ciclo menstrual, na cicatrização de feridas, no decorrer de uma resposta inflamatória e no crescimento tumoral (VARRICCHI et al., 2015). Consiste em várias etapas tendo como início a troca de um estado de quiescência das células endoteliais para um fenótipo angiogênico em resposta a determinados estímulos (RIBATTI, NICO & CRIVELLATO, 2009). O controle deste processo é regulado por fatores de crescimento, proteínas ligadas à membrana plasmática, interações célula-célula e célula-matriz e forças hemodinâmicas, sendo necessária uma atividade balanceada entre as moléculas angiogênicas, capazes de iniciar esta resposta, e moléculas anti-angiogênicas capazes de interromper a mesma (NEVE et al., 2014)

A forma mais comum de expansão vascular é através do brotamento endotelial, pela qual as células endoteliais migram e proliferam-se ocupando áreas avascularizadas. Nessa nova ramificação podemos observar três distintos fenótipos destas células, as *tip cells*, altamente polarizadas, com pouca capacidade proliferativa e dotadas de uma maquinaria proteolítica, composta principalmente pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), com destaque para a colagenase MMP-1, que permite a migração e invasão da matriz extracelular subjacente na direção do gradiente de concentração de certas citocinas, nesse caso a principal delas é o VEGF. Já as *stalk* e *phalanx cells* possuem pouca capacidade migratória, formando o lúmen e estabilizando o vaso nascente (Figura 3) (DE SMET et al., 2009; ARROYO & IRUELA-ARISPE, 2010).

As células endoteliais interagem com a matriz subjacente por meio de ligações adesivas estabelecidas pelas integrinas, glicoproteínas transmembranas compostas por duas subunidades, α e β ligadas não covalentemente. Através dessas interações os componentes da matriz extracelular (MEC) são capazes de influenciar aspectos da biologia celular, como a migração, a proliferação, a organização do citoesqueleto, a sobrevivência e a estabilização da célula endotelial (VAN HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008).

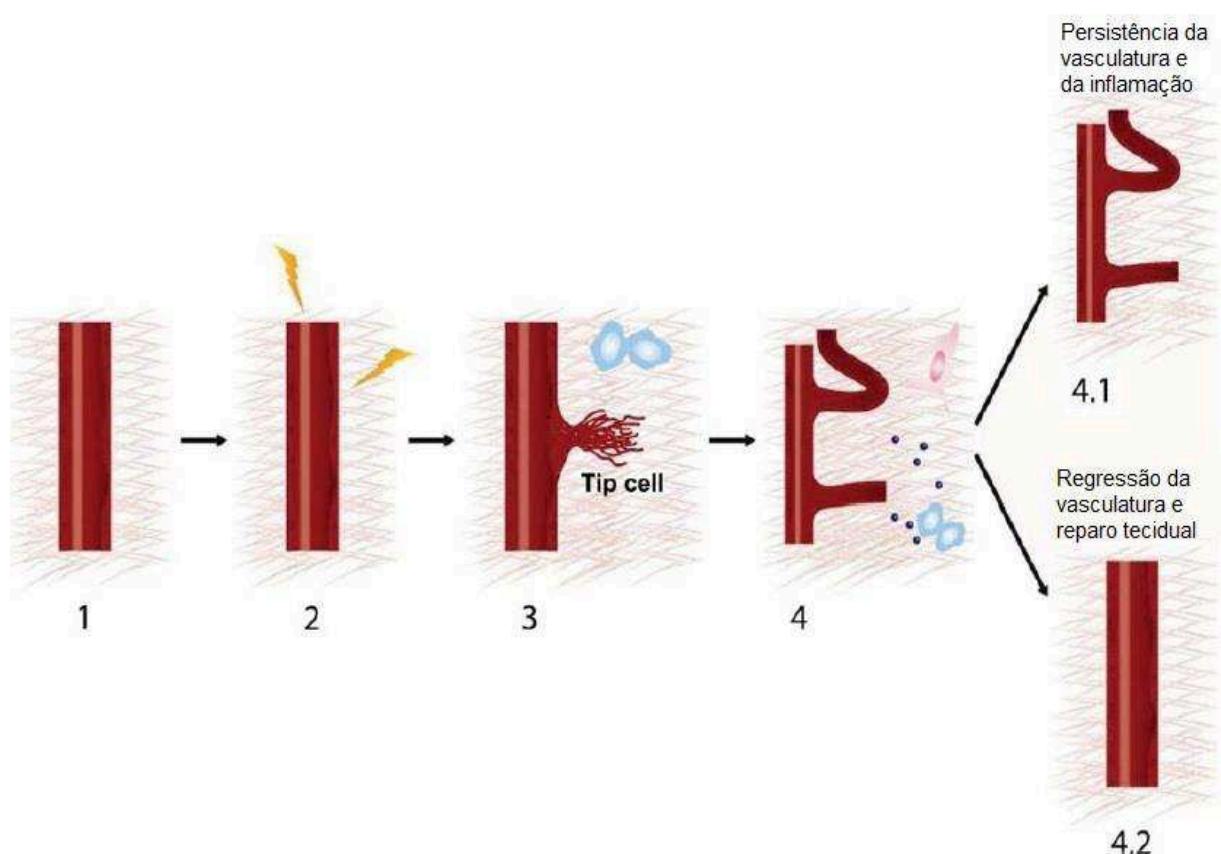


Figura 3 – Passos da angiogênese em direção ao estímulo inflamatório. (1) Vasculatura quiescente. (2) A ativação do processo de angiogênese em resposta a estímulos inflamatórios locais ou sistêmicos leva a um aumento da permeabilidade e a desestabilização das junções entre as células endoteliais. (3) Durante o brotamento endotelial as *tip cells* promovem a degradação da MEC em resposta ao estímulo inflamatório. (4) A degradação da matriz leva a liberação de sítios matricríticos e fatores de crescimento que regulam este processo. A angiogênese em resposta a um estímulo inflamatório pode apresentar dois destinos: (4.1) Persistência da vasculatura e cronificação do processo inflamatório. (4.2) Reparo tecidual e regressão da vasculatura (Figura adaptada de ARROYO & ARISPE. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, pp. 227, 2010).

A matriz extracelular garante o adequado funcionamento celular, não apenas por fornecer o suporte estrutural necessário, mas também por possibilitar a interação entre a célula e o microambiente extracelular (KIM, TURNBULL & GUIMOND, 2011). Os componentes que constituem a MEC possuem propriedades bioquímicas, biofísicas e estruturais que possibilitam a sinalização de informações específicas para as células, modulando, por exemplo, funções imunes essenciais, dentre elas a migração de células do sistema imunológico para os sítios inflamatórios, além de sua ativação e proliferação (SOROKIN, 2010).

A MEC é composta por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas presentes no tecido conjuntivo (MAQUART & MONBOISSE, 2014). Essa estrutura é altamente dinâmica e constantemente sujeita a processos de remodelamento, onde muitos desses componentes são depositados, degradados e remodelados (LU et al., 2011). O remodelamento da matriz extracelular em tecidos inflamados, afeta diretamente tanto a progressão da inflamação quanto a sua cronificação. A secreção de proteases, principalmente de metaloproteinases, e a deposição de uma nova matriz são eventos sujeitos a atividade de citocinas, dentre elas TNF, IFN- γ e TGF- β .

Sabe-se que as MMPs, antes vistas apenas como as principais responsáveis pela degradação da MEC, desempenham um importante papel na resposta inflamatória, pela geração de moléculas bioativas a partir da clivagem de componentes da matriz extracelular, entre outras moléculas como quimiocinas e citocinas (MORISSON et al., 2009). Estes produtos gerados influenciam na atividade tanto das células residentes teciduais, quanto daquelas provenientes do infiltrado inflamatório (SOROKIN, 2010).

Outro aspecto interessante sobre a atividade das metaloproteinases de matriz é a dualidade na maneira como estas interferem no processo angiogênico, uma vez que são extremamente necessárias para a migração das células endoteliais, mas também acabam originando inibidores endógenos da angiogênese, resultantes da proteólise dos componentes da MEC (ROY, ZHANG & MOSES, 2006).

As células respondem as alterações da matriz extracelular através do *cross-talk* existente entre as integrinas e o citoesqueleto de actina (ALAM et al., 2007). Esses receptores transmembrana possuem a capacidade única de responder frente à composição molecular e as propriedades físicas da MEC, integrando sinais químicos e mecânicos do meio extracelular diretamente ao citoesqueleto celular (KIM, TURNBULL & GUIMOND, 2011).

As integrinas são uma família de moléculas de adesão celular constituídas por um heterodímero formado pela combinação de duas subunidades, α e β . Atualmente 24 integrinas são conhecidas em mamíferos, formadas pela combinação entre uma das 18 subunidades α e uma das 8 subunidades β descritas, estando presentes em todos os tipos celulares, com exceção dos eritrócitos (FRANCESCHI, 2015). Na ausência de sinais para a sua ativação, como a presença de quimiocinas, estes receptores permanecem em um estado inativo. Quando ativadas, mudanças conformacionais expõem os sítios de ligação para seus ligantes no domínio extracelular (ASKARI et al., 2007; TIWARI et al., 2011).

As integrinas atuam através de diversas vias de sinalização, capazes de alterar aspectos do funcionamento celular, tais como a organização do citoesqueleto, a transdução de sinais intracelulares, o crescimento, a proliferação, o desenvolvimento, a sobrevivência e a adesão celular. Estão também envolvidas em processos como o reparo tecidual, a transmigração de leucócitos, além de algumas condições patológicas, como por exemplo, a aterosclerose, a psoríase e o desenvolvimento de tumores. Sendo assim, a procura por moléculas capazes de interagirem com estes receptores e de alguma maneira modular as funções a estes associados são de grande valia na busca por novos agentes terapêuticos (GOODMAN & PICARD, 2012; CASSINI-VIEIRA et al., 2014).

Nesse contexto, tendo em vista a rica variedade de compostos presentes na peçonha das serpentes, a pesquisa com as desintegrinas, pequenas moléculas não enzimáticas, ricas em resíduos de cisteína e capazes de interagirem especificamente com as integrinas, tem inspirado diversos estudos na busca por moléculas com potencial farmacológico (MACEDO, FOX & CASTRO, 2015).

1.2 – Jararagina-C (Jar-C), desintegrinas e a peçonha de serpentes.

Bothrops jararaca é uma serpente de grande importância médica devido ao grande número de acidentes ofídicos a ela relacionados, principalmente na região sudeste do Brasil. Dentre os sintomas associados aos casos de envenenamento envolvendo essa espécie, destacam-se comumente alguns distúrbios da hemostasia, hemorragia local ou sistêmica e lesão tecidual local ou sistêmica, com consequências dependentes da intensidade do acidente. (KAMIGUTI et al., 1991). A peçonha de *B. jararaca* contém uma elevada quantidade de toxinas que se relacionam com os efeitos mencionados, induzindo-os, assistindo-os e mantendo tais processos patológicos, dentre estas destacam-se as lecitinas, hemorraginas, serina-proteases, desintegrinas, dentre outras. Em recentes estudos de proteômica, mais de 200 proteínas diferentes foram reveladas como componentes da peçonha da jararaca (FOX et al., 2002; WHITE, 2005).

A peçonha de serpentes é uma complexa mistura contendo centenas de moléculas farmacologicamente ativas, incluindo entre elas componentes orgânicos, minerais e proteínas, tais como lecitinas tipo-C, fosfolipases A₂, peptídeos potenciadores da bradicinina, metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMP), serina-proteases do veneno de serpentes (SVSP), dentre outros constituintes, que podem variar em sua quantidade de acordo com a idade e com o sexo do animal (ZELANIS et al., 2012; ZELANIS et al., 2016) . Os efeitos biológicos destas peçonhas são complexos, uma vez que podemos identificar diferentes componentes com distintas ações sobre os organismos afetados. A toxicidade desta mistura desempenha papel importante em uma variedade de processos adaptativos, imobilizando, paralisando e até mesmo matando sua presa. De acordo com o seu principal efeito tóxico, a peçonha pode ser classificada, de acordo com sua ação, em neurotóxica ou hemorrágica. (CALVETE et al., 2005).

As proteínas de peçonhas de ação hemorrágica podem ser agrupadas em algumas grandes famílias, possuindo ou não atividade enzimática (JUÁREZ et al., 2004). Dentre as que possuem atividade enzimática, podemos destacar as metaloproteinases do veneno de serpentes, que por sua vez são subdivididas em 3 classes de acordo com seu domínio estrutural. As metaloproteinases PI possuem apenas um domínio metaloproteinase, com atividade hemorrágica fraca. A classe PII contém um domínio desintegrina na sua extremidade carboxi-terminal, um domínio metaloproteinase estruturalmente semelhante a PI e, frequentemente se encontra processada na peçonha. A classe PIII apresenta uma potente

atividade hemorrágica com um domínio catalítico N-terminal, um domínio tipo-desintegrina e um domínio rico em cisteinas (FOX & SERRANO, 2008).

A jararagina foi a primeira metaloproteinase do veneno de serpentes a ser isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* e a ter a sua estrutura primária completamente caracterizada, o que possibilitou o avanço nos estudos sobre a estrutura e a função destas proteínas. Essa toxina foi assim nomeada de acordo com a espécie da serpente (jarar-) e sua atividade hemorrágica (-hagin) (Paine et al., 1992).

A molécula de jararagina contém 1 domínio catalítico em sua estrutura, contendo o íon zinco em seu sítio ativo. Este domínio apresenta estrutura e função semelhante àquelas encontrados nas metaloproteinases de matriz. Além disso, ligada à extremidade C-terminal dessa região são encontrados dois domínios não catalíticos, um domínio tipo-desintegrina e um domínio rico em cisteínas (Figura 4). Ao contrário do que se é comumente observado, no domínio tipo-desintegrina da jararagina há uma substituição da sequência de aminoácidos presentes no motivo de ligação às integrinas, enquanto as desintgrinas clássicas apresentam um tripéptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) em sua estrutura de aminoácidos, essa toxina possui uma sequência do tipo ECD (Glu-Cys-Asp) para ligação à estes receptores (FOX & SERRANO, 2008; TAKEDA et al., 2006).

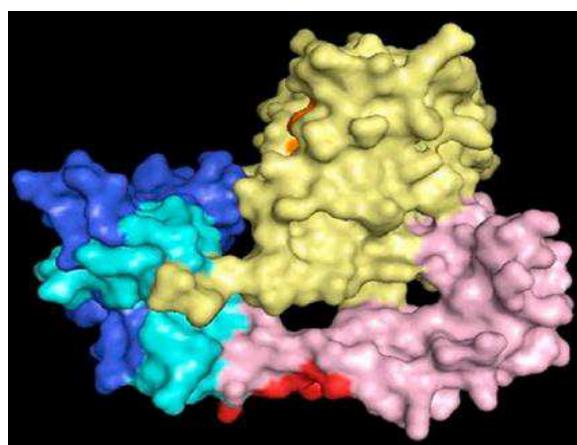


Figura 4 – Representação esquemática da molécula da Jararagina. Em amarelo o domínio metaloproteinase, em rosa o domínio tipo-desintegrina e em azul claro o domínio rico em cisteínas. Além destes ainda podemos evidenciar na figura a região de ligação ao zinco em laranja, o epítopo de ligação ao colágeno em vermelho e o fragmento JC76 em azul (Figura extraída de TANJONI, et al. Different regions of the class P-III snake venom metaloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin and collagen. Toxicon, pp. 1098, 2010).

As desintgrinas foram caracterizadas como um grupo de polipeptídeos ricos em resíduos de cisteína, de baixa massa molecular, capazes de inibir a agregação plaquetária de

forma rápida e eficiente. Podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua estrutura e função. Estruturalmente, as desintegrinas podem ser agrupadas em monoméricas e diméricas. As primeiras são agrupadas de acordo com o tamanho de sua cadeia polipeptídica e o número de cisteínas em desintegrinas curtas (8 cisteínas), médias (12 cisteínas) e longas (14 cisteínas). Já as desintegrinas diméricas possuem 10 resíduos de cisteína em cada subunidade (MARCINKIEWISK, 2013). A classificação funcional é dada pela presença de um padrão tripeptídico no local ativo, como já mencionado, é comum observarmos em metaloproteinases PIII o tripeptídeo ECD, que se liga a integrina $\alpha_2\beta_1$, um receptor para colágeno do tipo 1. Já o tripeptídeo RGD possui afinidade principalmente pelas integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ que são os receptores de vitronectina, fibronectina e fibrinogênio que também estão envolvidos na agregação plaquetária, e ainda desempenham papel nos mecanismos de proliferação celular, apoptose, adesão, migração e angiogênese (Figura 4) (MINEA et al., 2010; MONTENEGRO et al., 2012).

Em 1994, Usami e colaboradores, purificaram uma proteína de 28KDa à partir da peçonha de *B. jararaca*, determinando também a sua estrutura primária, que por sua vez acabou revelando tratar-se de uma sequência derivada da extremidade C-terminal da molécula de jararagina. Esta nova proteína consistia em apenas dois domínios, um domínio tipo-desintegrina em sua extremidade N-terminal e um domínio rico cisteínas em sua extremidade C-terminal. Devido à perda do domínio metaloproteinase, assumiu-se que esta nova molécula seria o resultado de um processo de autólise daquela metaloproteinase presente no veneno desta serpente, sendo denominada de Jararagina-C.

Tanto a jararagina, quanto a sua forma processada jararagina-C, apresentam alta afinidade de ligação seletiva à integrina $\alpha_2\beta_1$ presente em diferentes tipos celulares (MOURA-DA-SILVA et al., 2001). Essa especificidade apresenta uma importância ímpar sobre os eventos decorrentes do envenenamento (COSTA et al., 2002; COSTA, et al. 2004; CLISSA et al., 2006).

O domínio rico em cisteínas apresenta 28 resíduos deste aminoácido, não possuindo atividade catalítica, mas contribuindo para a ação da toxina uma vez que diferentes regiões do mesmo estão relacionadas à ligação da molécula de jararagina ao colágeno, a integrina $\alpha_2\beta_1$, ao fator de von Willebrand e a outras proteínas da matriz extracelular, resultando na proteólise específica destes substratos (TANJONI et al., 2010).

Além da relação da integrina $\alpha_2\beta_1$ com a locomoção dos neutrófilos para os sítios extravasculares, ela também está associada à reorganização e contração da matriz colagenosa,

eventos importantes durante o processo de angiogênese e reparo tecidual (FOUGEROLLES et al., 2000). Por fim, é importante ressaltar que outras células essenciais para o desenvolvimento adequado de uma resposta inflamatória, como macrófagos, mastócitos, fibroblastos e células endoteliais também expressam esse receptor (ZWEERS et al., 2007). A literatura nos mostra que a ligação de toxinas aos receptores integrinas é capaz de induzir respostas antagonistas, bloqueando a sua função, quanto desencadear uma ação agonista, levando a ativação de vias de transdução de sinais pelo ligação ao receptor (MOURA-DA-SILVA et al., 2007)

Estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram a capacidade da jararagina e da jararagina-C em desencadear uma resposta inflamatória, seja pela avaliação da produção de citocinas inflamatórias, pelo acúmulo de leucócitos e monócitos no sítio da lesão ou por induzir a apoptose de certos tipos celulares (CLISSA et al., 2001; CLISSA et al., 2006 & FERRAZ et al., 2015). No entanto, o papel dos diferentes domínios frente à resposta inflamatória, bem como os eventos a ela associados, ainda não estão totalmente esclarecidos.

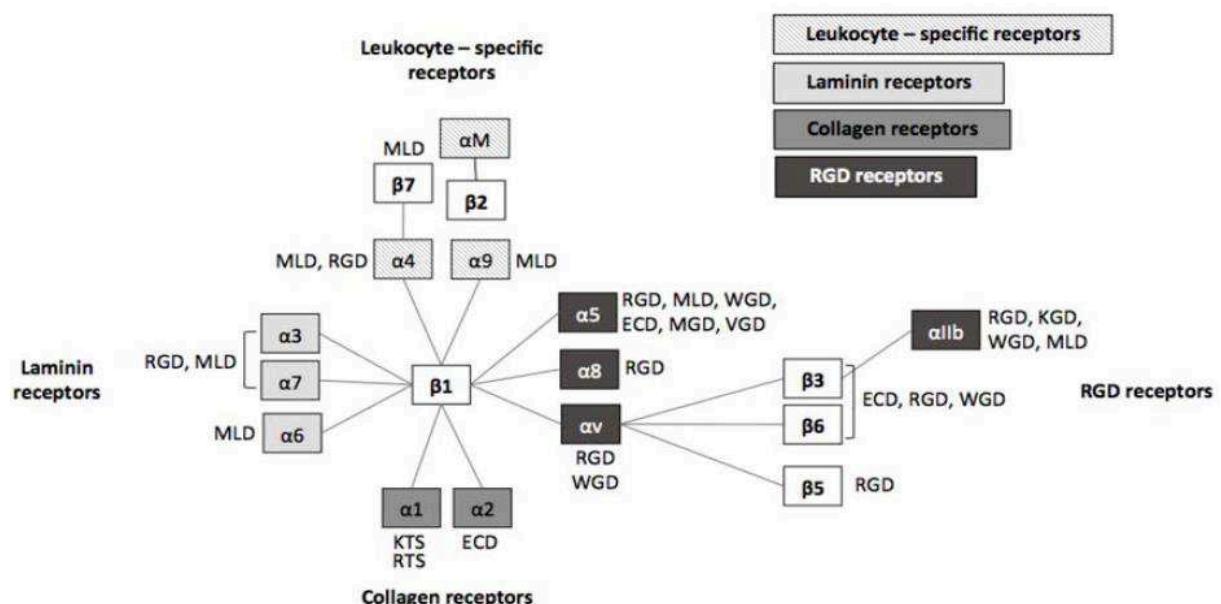


Figura 5 – Diagrama esquemático entre os sítios ativos presentes nas desintegranas da peçonha de serpentes (sequência de tripeptídeos) e as integrinas humanas (MACÊDO et al. Disintegrins from Snake Venoms and their Applications in Cancer Research and Therapy. Current Protein and Peptide Science, pp. 533, 2015).

Portanto, a utilização de modelos experimentais que possibilitem a avaliação concomitante dos componentes inflamatórios, angiogênicos e de reparo se faz necessária, de modo a possibilitar a avaliação dos efeitos de diferentes moléculas sobre estes processos. Além disso, é de grande importância que este modelo experimental seja facilmente reproduzível. Neste sentido o modelo experimental de implantes sintéticos representa o modelo mais adequado para avaliar os efeitos de desintegranas na resposta inflamatória.

1.3 – Implantes sintéticos (modelo experimental)

Inicialmente descrito em 1951 por Grindlay & Waugh e posteriormente modificado por Andrade e colaboradores (1987), o modelo de implantação subcutânea de uma matriz sintética (esponjas de poliéster poliuretano) foi inicialmente proposto como um método de avaliação para a angiogênese, tendo em vista as dificuldades dos modelos disponíveis para a época.

Com o passar dos anos a técnica vem ganhando novos espaços na pesquisa científica, servindo de modelo para testes da modulação da resposta inflamatória, da angiogênese e do reparo tecidual por novas substâncias com potencial ação terapêutica (CASSINI-VIEIRA, et al., 2014; PEREIRA, et al., 2012; ARAÚJO et al., 2010; MENDES, 2009). Além disso, há também um considerável interesse pelo entendimento dos processos de biocompatibilidade a materiais exógenos que podem ser explicados pelo uso desta, auxiliando em áreas como a bioengenharia tecidual (CASSINI-VIEIRA et al., 2015).

A implantação de uma matriz sintética induz a proliferação do tecido fibrovascular de modo semelhante ao observado em alguns processos fisiológicos (cicatrização de feridas) e patológicos (inflamação crônica, crescimento tumoral). Esse modelo permite a caracterização de componentes essenciais desse tecido (identificação do infiltrado inflamatório, formação de novos vasos sanguíneos e a deposição de matriz extracelular) e a análise bioquímica dos fluidos coletados, pela geração de um microambiente característico de processos inflamatórios crônicos do tipo corpo estranho, com formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, neovascularização e deposição de matriz extracelular, envoltos por um tecido fibroso em forma de capsula (CASSINI-VIEIRA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2010 e 2011; MENDES, et al., 2009; ROCHA, et al., 2006; ANDRADE et al., 1997).

Desse modo o presente trabalho teve como foco principal investigar os efeitos da molécula de Jararagina-C, uma molécula tipo-disintegrina, isolada da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, sobre os componentes do tecido fibrovascular induzido pela implantação cirúrgica de matriz sintética no espaço subcutâneo de camundongos Balb/c.

2. Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da Jararagina (JAR-C), isolada do veneno de serpente, na modulação da inflamação crônica induzida por implantes de esponja em camundongos.

2.2 - Objetivos específicos

Avaliar através de parâmetros bioquímicos o efeito desta molécula tipo-desintegrina, *desintegrin-like*, nos processos inflamatório e angiogênico do tecido fibrovascular;

Determinar a influência deste composto na produção de citocinas pró-angiogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (VEGF, TNF- α , TGF β -1, CXCL1/KC e CCL-2/JE/MCP);

Avaliar histologicamente a influência deste composto nos componentes celulares do tecido fibrovascular induzido pelos implantes de esponjas.

3. Materiais e métodos

3.1 – Obtenção da peçonha

A Jararagina-C foi purificada a partir da peçonha de *Bothrops jararaca* pelos princípios cromatográficos de interações hidrofóbica e de troca iônica, utilizando respectivamente as colunas Hi Trap Phenyl FF (Low sub) e Mono Q 5/50 GL em um sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) - FPLC - AKTA Purifier (GE). Para alcançar o nível de pureza necessário para a realização de nossos experimentos uma segunda etapa de purificação em coluna de troca iônica foi realizada sob as mesmas condições (PAINÉ et al., 1992; MOURA-DA-SILVA et al., 2003).

A concentração total de jararagina-C foi calculada pelo método de Bradford e sua pureza analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), descartando assim a incerteza quanto à presença de contaminantes. A atividade biológica da proteína foi confirmada com ensaios de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno tipo 1 (KAMIGUTI et al., 1996).

Todas as etapas referentes à obtenção da amostra foram realizadas pela Pesquisadora Científica Patrícia Bianca Clissa do Instituto Butantan, colaboradora deste projeto.

3.2 – Animais

Foram utilizados camundongos machos, albinos da linhagem Balb-c, com idade entre 7 e 8 semanas, pesando entre 25-30g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA). Os animais foram mantidos no Depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas- UFU, em gabinetes com controle de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12 h, *ad libitum* (com livre acesso a água e ração), durante todo o experimento.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a ética em pesquisa animal, sendo esse trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia, processo número (CEUA158/13)

3.3 – Procedimento Cirúrgico, técnica de implantação:

Discos de esponjas (poliéster poliuretano) de 8 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram mantidos em álcool 70% v/v durante pelo menos, 24 horas anteriores à implantação e,

posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos. Estes implantes foram utilizados para induzir a inflamação, angiogênese e fibrose subcutânea (CASSINI et al., 2014, ARAÚJO et al, 2010 e 2013, ANDRADE et al., 1987).

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

3.4 – Regime de tratamento com a JAR-C

Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle, tratado com solução salina e composto por 9 indivíduos, e três grupos tratados com jararagina-C nas doses de 20 ng , 200 ng e 2000 ng em 20 µL de solução salina, sendo o grupo de 20 ng composto por 9 animais e os demais por 10. Os animais receberam o tratamento intra-implante logo após o procedimento cirúrgico, durante todos os dias, no mesmo horário até o 8º dia pós-implantação (CASSINI-VIEIRA et al., 2014; RABELO, 2015).

3.5 - Remoção dos implantes

No 9º dia pós-implantação os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com tiopental 100 mg/kg via intraperitoneal. Após 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 adicionados em microtubos (eppendorff) de 2,0mL.

As amostras foram centrifugadas a 4°C por 40 minutos a 12.000 g e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22 µm (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 (etapa inicial das dosagens bioquímicas), o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de citocinas. A esponja dividida e pesada para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e Nacetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

3.7 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliarmos a atividade da mieloperoxidase, marcador quantitativo de neutrófilos utilizamos a técnica de Bradley et al, 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%, adicionar 100 µL de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); adicionar 200 µL do sobrenadante da amostra deixar reagir por 1 minuto cronometrado, parar a reação com a adição de 100 µL de 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 MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido do implante).

3.8 - Avaliação da atividade de NAG

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).

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

Para o ensaio, foram adicionados 100 μ L das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Nas amostras, foram adicionados 100 μ L do substrato (p-nitrofenil-n-acetil- β -D-glicosaminida– Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100 μ L de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente.

O p-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-nacetil- β -D-glicosamina 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

Foram dosadas citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , VEGF e TGF β -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 100 μ L/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 300 μ L/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, 100 μ L/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 100 μ L/poço de solução de anticorpo (biotinilado anti-camundongo) para a citocina em questão. As placas foram incubadas por 2 horas. Após lavagem, foram adicionados 100 μ L/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.

Para a análise da citocina TGF β -1, as amostras foram previamente ativadas adicionando HCl 1 mol/L a um volume de cinco vezes da amostra, misturado e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida foram adicionados NaOH 1,2N/HEPES 0,5 mol/L (na mesma quantidade de HCl) para neutralizar a reação.

3.10 - Avaliação da deposição de colágeno solúvel

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 (2006).

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 *Picrossirius Red* em 50 μ L da amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrosírus red foi separado por centrifugação a 10,000 g 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 de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merck) e os resultados expressos em μ g de colágeno por mg de implante.

3.11 - Análise histológica das matrizes esponjosas

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: 1) Hematoxilina-eosina, para visualização do infiltrado tecidual e quantificação de vasos. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X) em microscópio LEICA ICC50. 2) Picosírius red para avaliação da deposição de colágeno (objetiva de 20X, ocular de 10X) microscópio Nikon TS 100. Cada corte teve o registro fotográfico na área total de tecido fibrovascular formado no implante, exceto na região central onde houve as injeções de tratamento. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Histologia (UFU).

3.12 – 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, quando os dados consistiram de mais de dois grupos foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-keuls. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$. Para realização da análise e construção de gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.

4. Resultados

Após os 9 dias de experimento, observou-se a tolerância por parte dos animais tanto com relação ao procedimento cirúrgico quanto a implantação da matriz sintética e a administração do tratamento. Não foram observados sinais de alteração de comportamento, infecção ou rejeição dos implantes, nem de toxicidade, como perda de peso e/ou apatia, por parte dos animais.

4.1 - Efeito da Jar-C sobre o infiltrado fibrovascular no implante de esponja

Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas com relação ao peso úmido dos implantes (mg); $148,2 \pm 8,15$ (controle) versus $147,5 \pm 7,17$ (20 ng), $151,4 \pm 7,41$ (200 ng) e $147,7 \pm 7,28$ (2000 ng) (gráfico 1).

4.2 - Efeito da Jar-C sobre componentes do infiltrado inflamatório

Os componentes inflamatórios foram determinados pela avaliação da atividade enzimática de leucócitos existentes nos implantes, bem como pela produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória.

O tratamento com a Jararagina-C aumentou significativamente o conteúdo de neutrófilos, avaliado indiretamente pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), com a administração das concentrações de 200 ng e 2000 ng da desintegrina, comparadas ao grupo controle; $0,6368 \pm 0,3036$ (controle) versus $1,13 \pm 0,27$ (20 ng), $2,62 \pm 0,32$ (200 ng) e $4,04 \pm 0,45$ (2000 ng) (gráfico 2). Quando avaliada a quimiocina CXCL-1/KC, uma das principais quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, também observamos um aumento desta, nas mesmas doses observadas anteriormente, quando comparadas ao grupo controle; $1,89 \pm 0,33$ (controle), $1,70 \pm 0,29$ (20 ng), $3,37 \pm 0,33$ (200 ng) e $4,28 \pm 0,72$ (2000 ng) (gráfico 3).

A avaliação do conteúdo de macrófagos, feita com base na dosagem da atividade da enzima NAG, apresentou um aumento significativo nas doses de 200 ng/ 20 μ l e 2000 ng/ 20 μ l, comparadas ao grupo controle; $0,66 \pm 0,09$ (controle), $0,72 \pm 0,10$ (20 ng), $0,99 \pm 0,06$ (200 ng) e $1,09 \pm 0,07$ (2000 ng) (gráfico 4). Esse efeito também foi observado na avaliação do conteúdo da quimiocina CCL2/JE/MCP-1, principal responsável pelo recrutamento deste tipo celular, nas mesmas doses, quando comparadas ao grupo controle; $2,57 \pm 0,15$ (controle), $2,987 \pm 0,13$ (20 ng), $3,42 \pm 0,21$ (200 ng) e $3,98 \pm 0,29$ (2000 ng) (gráfico 5).

Os efeitos da Jararagina-C sobre os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α também apresentaram o mesmo perfil das avaliações anteriores, com um aumento da concentração desta citocina nas doses 200 ng/ 20 μ l e 2000 ng/ 20 μ l, quando comparadas com o grupo controle; $7,63 \pm 0,82$ (controle), $5,85 \pm 0,95$ (20 ng), $10,59 \pm 0,56$ (200 ng) e $12,86 \pm 0,48$ (2000 ng) (gráfico 6).

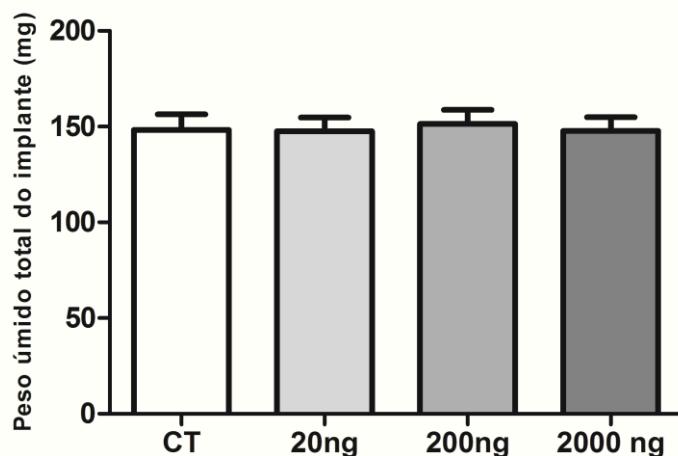


Gráfico 1: : Efeito do tratamento com a Jar-C sobre o peso úmido total dos implantes sintéticos subcutâneos em camundongos. Não houve variação no peso úmido dos implantes entre o grupo controle e as doses administradas. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos.

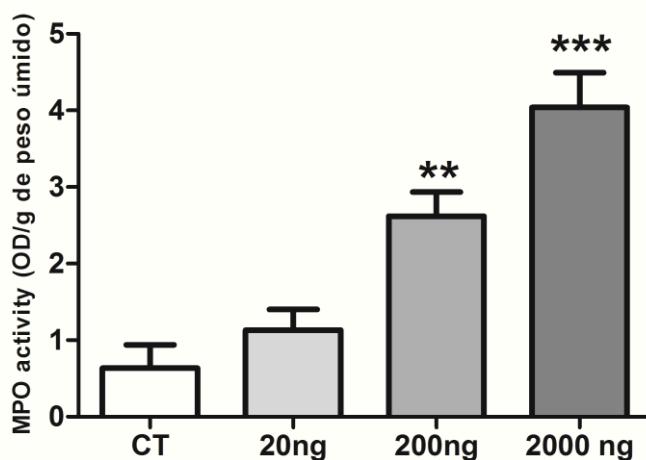


Gráfico 2: : Efeito do tratamento com a Jar-C na atividade enzimática da enzima mieloperoxidase. A atividade de MPO mostrou-se significativamente aumentada nas maiores doses administradas de Jararagina-C, 200 ng e 2000 ng. Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

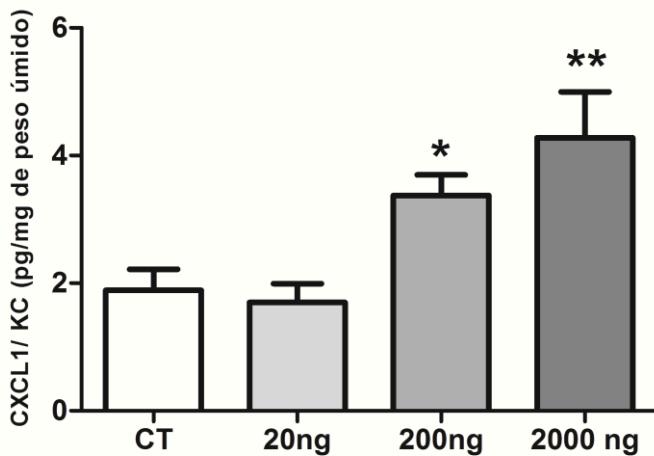


Gráfico 3: Efeito do tratamento com a Jar-C na concentração da quimiocina CXCL-1/KC. A concentração de CXCL-1/KC apresentou um aumento significativo nos tratamentos de 200 ng e 2000 ng. Os valores apresentam as médias (e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

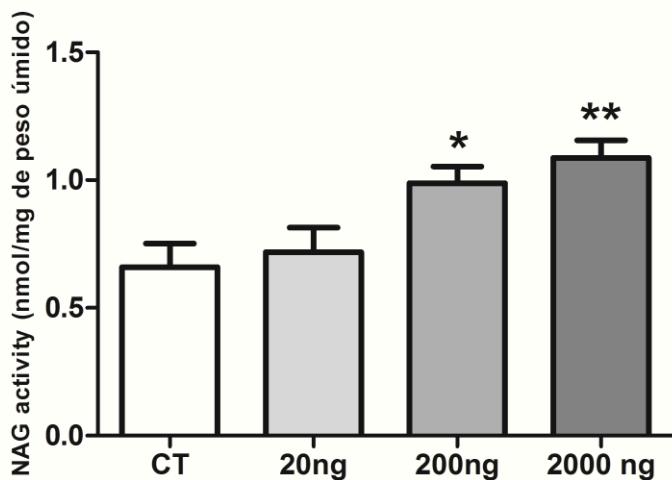


Gráfico 4: Efeito do tratamento com a Jar-C na avaliação da atividade da enzima N-acetyl- β -D-glicosaminidase (NAG). A atividade de NAG mostrou-se significativamente aumentada nas maiores doses, 200 ng e 2000 ng. Os valores apresentam as médias (e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

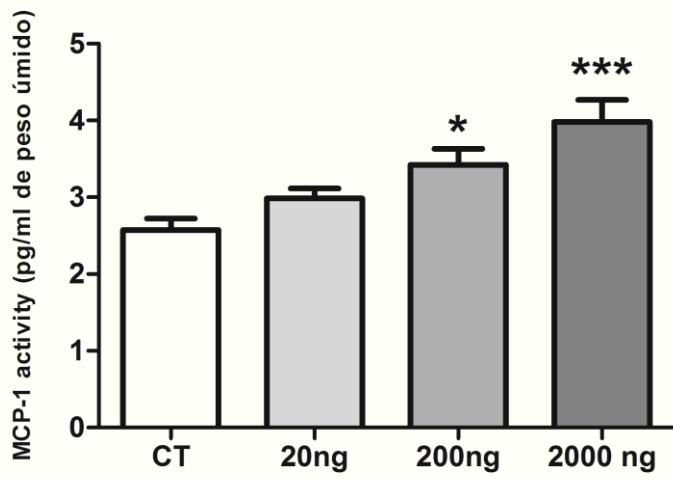


Gráfico 5: Efeito do tratamento com Jar-C na concentração da quimiocina CCL-2/JE/MCP-1. A concentração da quimiocina CCL-2/JE/MCP-1 mostrou-se significativamente aumentada nos implantes tratados com as doses de 200 ng e 2000 ng. Os valores apresentam as médias (e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

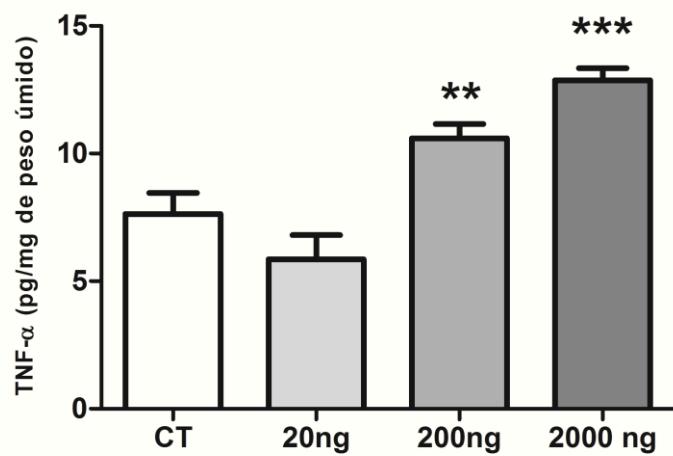


Gráfico 6: Efeito do tratamento com Jar-C na concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α . A concentração de TNF- α apresentou um aumento significativo nos implantes tratados com as doses de 200 ng e 2000 ng. Os valores apresentam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3 - Efeitos da Jararagina-C na angiogênese

A Jararagina-C alterou os níveis da citocina VEGF do tecido fibrovascular induzido por implantes subcutâneos.

A angiogênese foi avaliada indiretamente pelo conteúdo de hemoglobina nos implantes e, diretamente pela contagem de vasos sanguíneos nos cortes histológicos. Além disso, também avaliamos a citocina VEGF caracteristicamente pró-angiogênica e que em menor grau aumenta a permeabilidade das células endoteliais.

O tratamento com a Jararagina-C não alterou o conteúdo de hemoglobina em nenhuma das doses quando comparadas ao grupo controle; $1,30 \pm 0,14$ (controle), $1,12 \pm 0,15$ (20 ng), $1,12 \pm 0,16$ (200 ng) e $1,13 \pm 0,19$ (2000 ng) (gráfico 7). Esse mesmo comportamento foi observado durante a quantificação dos vasos nos cortes histológicos, ou seja, não observamos alterações entre o tratamento e o grupo controle; $66 \pm 1,87$ (controle), $59,75 \pm 1,75$ (20 ng), $67,25 \pm 2,17$ (200 ng) e $61,5 \pm 0,95$ (2000 ng) (gráfico 8).

Já a dosagem da citocina pró-angiogênica VEGF apresentou um aumento de sua concentração em todos os tratamentos administrados, quando comparadas ao grupo controle tratado com solução salina; $1,49 \pm 0,25$ (controle), $2,57 \pm 0,33$ (20 ng), $3,57 \pm 0,37$ (200 ng) e $3,73 \pm 0,09$ (2000 ng) (gráfico 9).

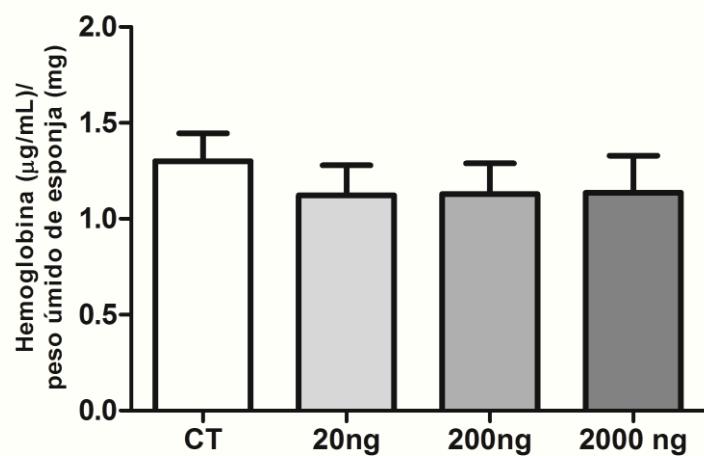


Gráfico 7: Efeito do tratamento com Jararagina-C no conteúdo de hemoglobina: O tratamento com a Jararagina-C não apresentou diferenças sobre o conteúdo de hemoglobina, independente da dose utilizada.

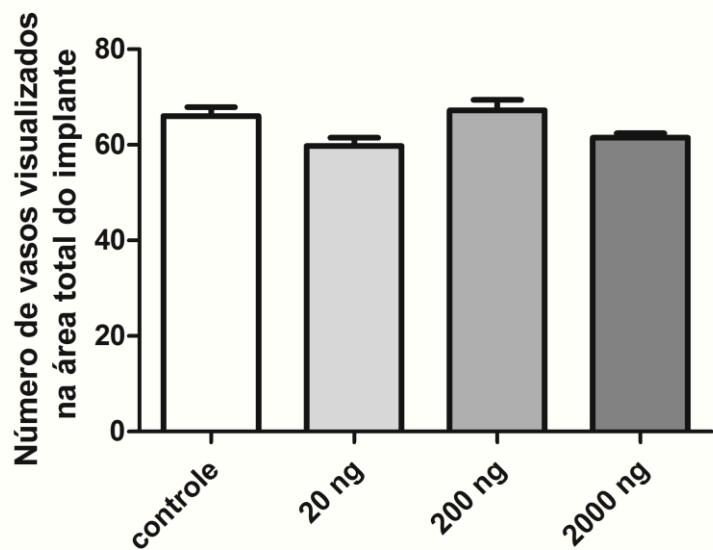


Gráfico 8: Número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos: O número de vasos sanguíneos não foi alterado com o tratamento da Jararagina-C, independente da dose administrada em relação ao grupo controle.

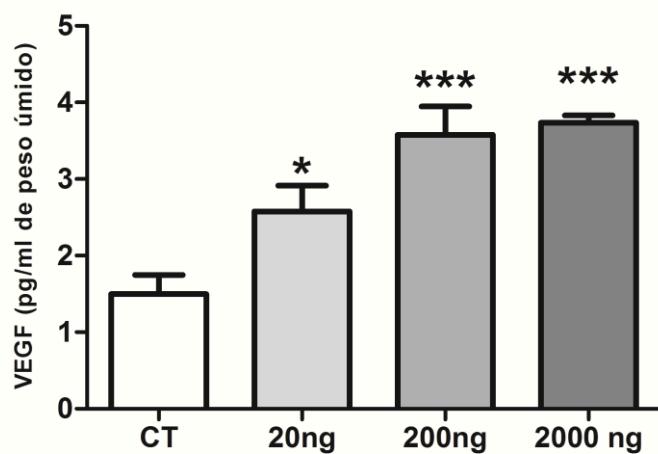


Gráfico 9: Efeito do tratamento com a Jararagina-C na concentração de VEGF nos implantes. O tratamento com a Jararagina-C foi capaz de aumentar a concentração de VEGF em todas as doses administradas. Os valores apresentam as médias (\pm e.p.m). * $p<0,05$ e *** $p<0,001$

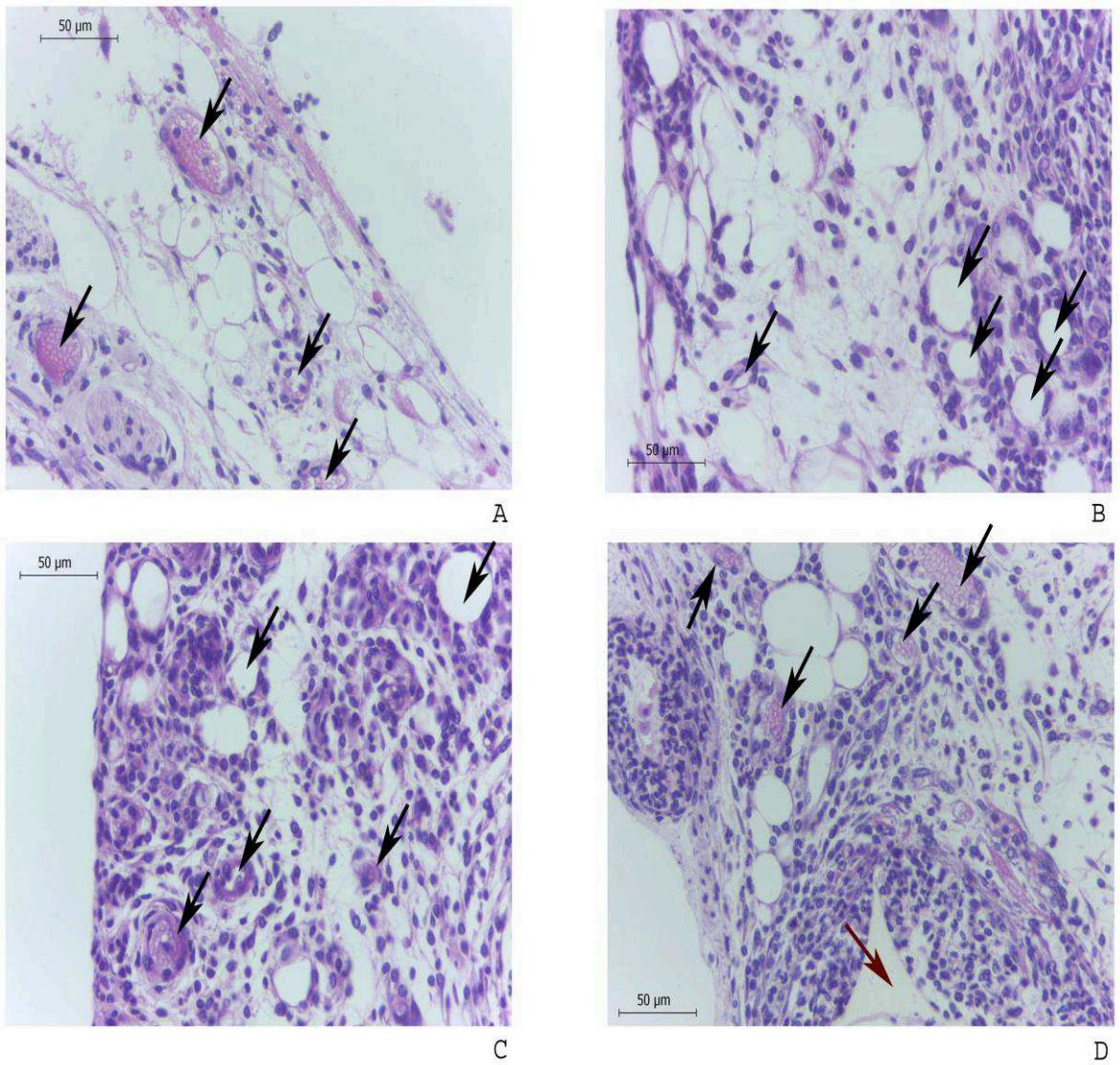


Figura 6 - Figura 10: Cortes histológicos ($5\mu\text{m}$, coloração Hematoxilina-Eosina) na matriz esponjosa dos implantes vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. A) Grupo controle salina; B) tratamento 20 ng; C) tratamento 200 ng; D) tratamento 2000 ng. As setas pretas mostram os vasos sanguíneos, enquanto que, a seta vermelha indica fragmentos do material sintético. Não houve diferença estatística para a contagem de vasos entre os grupos trabalhados.

4.4 - Efeito da Jararagina-C sobre a deposição de colágeno

A Jararagina-C alterou a dosagem bioquímica do colágeno solúvel total e dos níveis da citocina TGF- β 1.

O colágeno é o mais abundante dos constituintes da matriz extracelular, sendo de suma importância para o reparo tecidual, estágio final do processo inflamatório. A deposição de colágeno no tecido fibrovascular induzido por implantes foi avaliada pela dosagem bioquímica do colágeno solúvel e pela técnica histológica de coloração por *picrosírius red*, além da dosagem por ELISA da citocina TGF- β 1.

O tratamento com a Jararagina-C induziu a deposição de colágeno solúvel total avaliado pela dosagem bioquímica deste constituinte; $0,25 \pm 0,03$ (controle), $0,44 \pm 0,05$ (20 ng), $0,50 \pm 0,05$ (200 ng) e $0,23 \pm 0,03$ (2000 ng) (gráfico 11). No entanto, a mesma alteração não foi observada quando este mesmo parâmetro foi avaliado pela quantificação histológica de área marcada pela coloração por *picrossirius red*; $22,17 \pm 1,20$ (controle), $22,20 \pm 1,45$ (20 ng), $26,64 \pm 1,66$ e $17,56 \pm 1,82$ (2000 ng) (gráfico 12).

Já a análise da principal citocina pró-fibrogênica TGF- β 1, apresentou uma diminuição de sua concentração na dose de 2000 ng, quando comparado ao grupo controle; $8,40 \pm 0,80$ (controle), $7,32 \pm 0,47$ (20 ng), $9,07 \pm 0,64$ (200 ng) e $4,78 \pm 0,66$ (2000 ng) (gráfico 13).

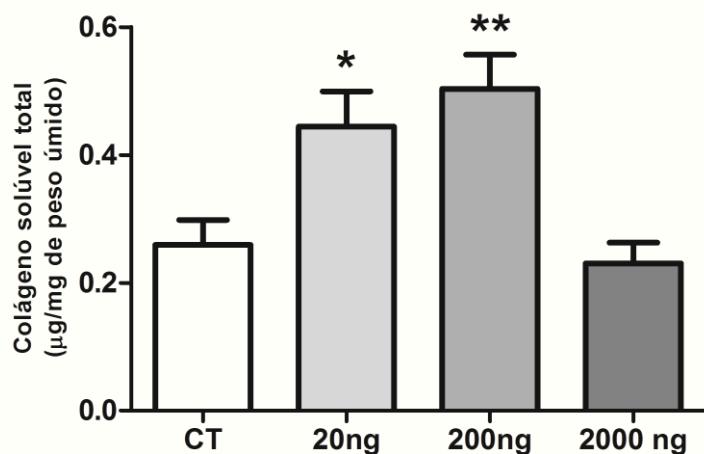


Gráfico 10: Efeito da Jararagina-C na concentração de colágeno solúvel total nos implantes subcutâneos.

Os tratamentos com as doses de 20 ng e 200 ng mostraram efeitos sobre a deposição de colágeno solúvel total, aumentando-a em relação ao grupo controle tratado com salina. Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

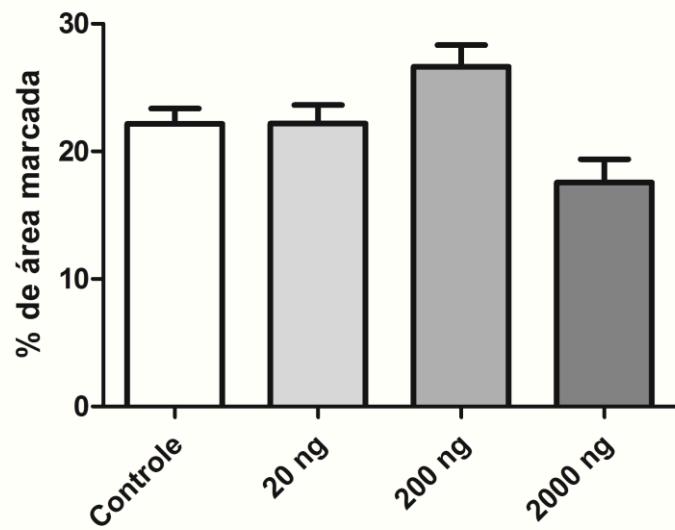


Gráfico 11: Efeitos da Jararagina-C sobre a deposição de colágeno total nos implantes subcutâneos através de análises histológicas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com as doses de Jararagina-C e o grupo controle, tratado com solução salina.

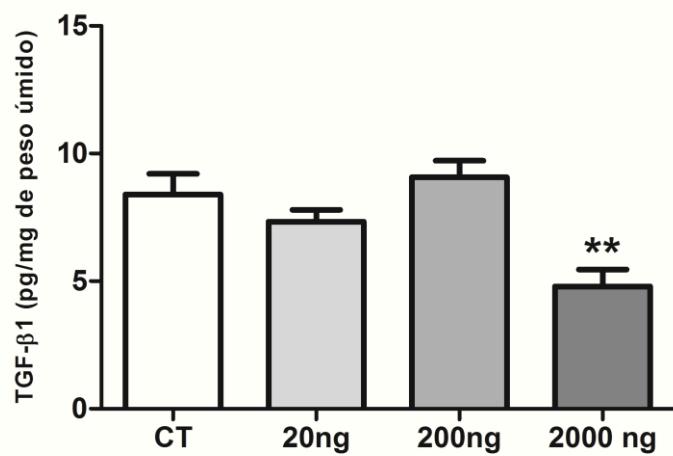


Gráfico 12: Efeitos do tratamento com a Jararagina-C sobre a concentração de TGF- β 1 nos implantes subcutâneos. Dentre os implantes tratados com a Jararagina-C, apenas a dose de 2000 ng apresentou diferença quando comparada ao grupo controle, diminuindo a concentração de TGF- β 1.

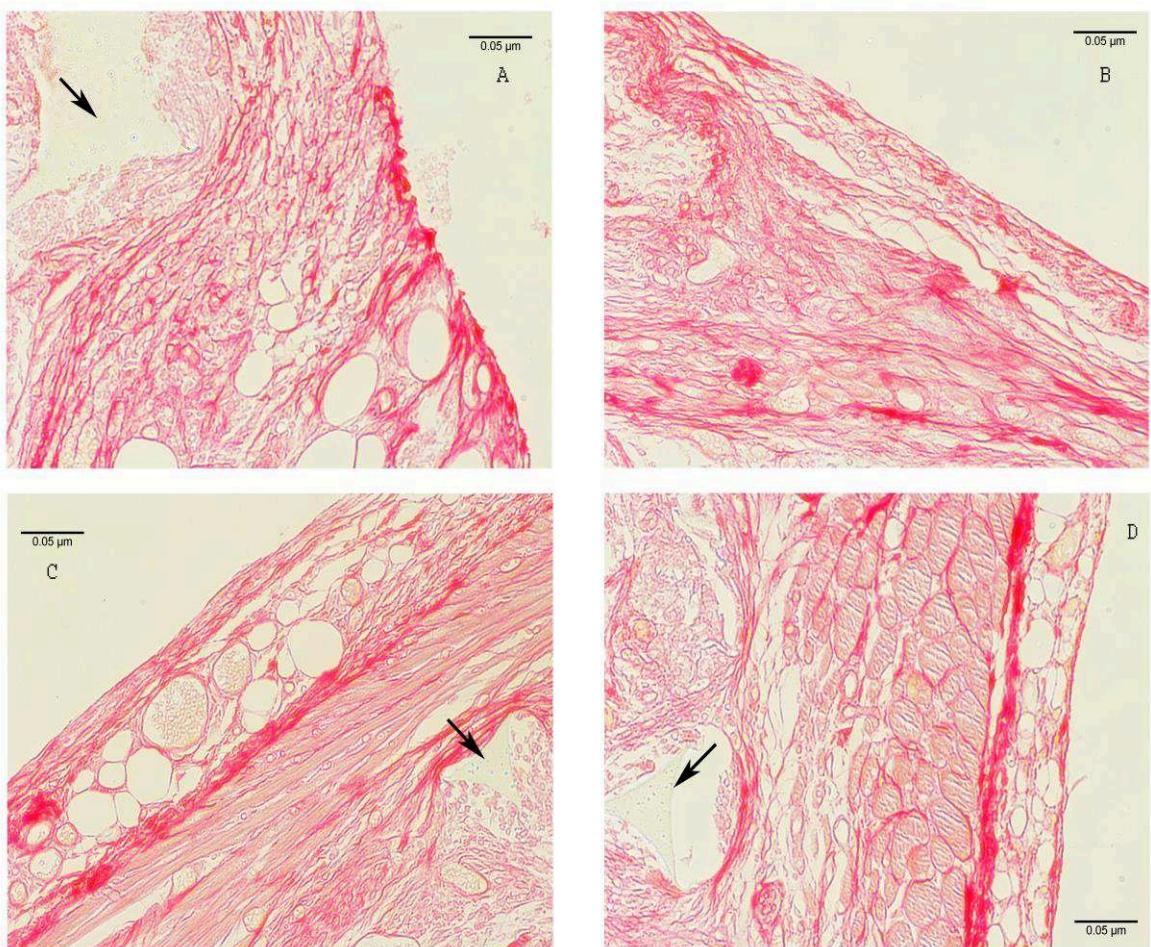


Figura 7: Cortes histológicos (5 μ m, coloração picrosírius). Deposição de colágeno total no infiltrado de tecido fibrovascular nos implantes subcutâneos nos camundongos. A) grupo salina picrosírius , B) 20ng, C) 200ng, D) 2000ng. Não houve diferença estatística na deposição de colágeno entre os tratamentos. – 0,05 μ m. n = 4 animais para cada grupo. As setas representam fragmentos do implante sintético.

5 - Discussão

O presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da Jararagina-C sobre um modelo de inflamação crônica *in vivo* induzida por implantes sintéticos em camundongos. Este modelo é capaz de induzir a proliferação de um tecido fibrovascular semelhante a processos fisiológicos e patológicos, permitindo a avaliação concomitante do infiltrado inflamatório, da angiogênese e do reparo tecidual, por análises bioquímicas e histológicas. A implantação subcutânea da matriz sintética permite ainda o estudo de diferentes compostos e toxinas com potencial terapêutico para modular tais processos e seus componentes (TEIXEIRA et al., 2015; CASSINI-VIEIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2010).

As integrinas constituem uma família de receptores transmembrana com a capacidade única de responder aos componentes moleculares e as propriedades físicas da matriz extracelular, integrando sinais do meio externo ao citoesqueleto celular, interferindo sobre diversos aspectos do comportamento celular como a proliferação, a sobrevivência, o crescimento, o desenvolvimento, a adesão celular e a transmigração de leucócitos, pela ativação de diferentes vias de sinalização (KIM, TURNBULL & GUIMOND, 2011; ASKARI et al., 2007; TIWARI et al., 2011).

Por estarem naturalmente relacionadas a processos fisiológicos e também a certas condições patológicas, como em doenças inflamatórias e no desenvolvimento tumoral, muitos estudos têm buscado novas moléculas capazes de interagirem com estes receptores e, de alguma forma, modular as atividades a estes associados, alterando, consequentemente, o comportamento celular (GOODMAN & PICARD, 2012; CASSINI-VIEIRA et al., 2014). Nesse contexto, as desintegrinas, polipeptídeos isolados da peçonha de serpentes, possuem a capacidade de inibir, bloquear ou modular as integrinas com as quais estabelecem associações (CALVETE, 2013; MACEDO, FOX & CASTRO, 2015).

O componente inflamatório foi avaliado pela mensuração da atividade enzimática de neutrófilos (níveis de mieloperoxidase) e macrófagos (níveis de n-acetil- β -D-glicosaminidase). Também foram quantificados os níveis da citocina inflamatória TNF- α e das quimiocinas CXCL-1/KC (capaz de exercer quimiotaxia sobre neutrófilos) e CCL-2/JE/MCP-1 (quimiotática para macrófagos).

O fator alfa de necrose tumoral, um potente agente pró-inflamatório, produzido primeiramente pelas células residentes do tecido, é capaz de induzir a produção de outras citocinas como IL-6 e IL-1 β , que em conjunto auxiliam na ativação das células endoteliais, levando a expressão de diferentes classes de moléculas de adesão necessárias para a

transmigração dos leucócitos da corrente sanguínea em direção ao sítio inflamatório, além disso, estimulam também a ativação de ciclooxigenases, resultando na produção de prostanoïdes e em uma hiperalgesia inflamatória, o TNF- α é ainda capaz de favorecer a liberação de quimiocinas como a CXCL1. Em nossos resultados observamos uma maior concentração de TNF- α nas doses de 200 ng e 2000 ng quando comparadas ao grupo controle, o que vai de acordo com os achados descritos na literatura, indicando o potencial pró-inflamatório da Jararagina-C.

Clissa e colaboradores (2006) dosaram os níveis de TNF- α 2 horas após a administração subcutânea de 1 μ g de Jararagina-C em patas de camundongos da linhagem BALB/c, realizaram também o mesmo tratamento com a Jararagina. Quando comparados aos grupos controle com PBS e sem tratamento, ambos os compostos apresentaram um aumento nos níveis dosados de TNF- α . Ferraz e colaboradores (2015), utilizando camundongos Swiss, administraram os mesmo valores de doses de Jararagina nas patas dos animais, avaliando os níveis de produção desta citocina nos tempos de 0,5, 1, 3 e 5 horas após a injeção da toxina. Assim, como no estudo anterior, a Jararagina foi capaz de aumentar os níveis de TNF- α quando comparadas ao controle, nos tempos de 1, 3 e 5 horas.

Em um estudo *in vitro*, Clissa e colaboradores em 2001, mostraram uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos peritoneais murinos tratados com jararagina, aumentando a tradução de mRNA para IL-6, TNF- α e IL-1 β . Tais experimentos vão de encontro aos nossos resultados e reafirmam a capacidade dos domínios *desintegrin-like/cisteín-rich* em sustentarem por si só a produção e liberação de citocinas, uma vez que apresentam efeitos semelhantes aos da jararagina com seu domínio catalítico ativo.

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a responder frente a um estímulo nocivo, migrando em direção ao sítio inflamatório, em resposta a um gradiente de concentração quimiotático formado pela liberação de diferentes quimiocinas, dentre elas a CXCL-1/KC. Junto ao local da lesão age pela liberação de espécies reativas de oxigênio, catalisada pela enzima MPO (O'CONNOR & NICHOL, 2015; HUANG et al., 2016).

O tratamento com a jararagina-C aumentou significativamente, nas doses de 200 ng e 2000 ng, a atividade de MPO, sugerindo um aumento no conteúdo de neutrófilos no local da inflamação. Esse aumento foi também acompanhado por uma maior quantidade dos níveis de CXCL-1/KC nas mesmas doses.

Clissa e colaboradores (2006) ao avaliarem os efeitos *in vivo* da Jararagina-C, através de microscopia intravital do músculo cremaster de camundongos BALB/c, constataram um

aumento no número de neutrófilos nas vênulas pós-capilares nos animais tratados com a desintegrina quando comparados ao grupo controle, esse mesmo aumento foi constatado nos animais tratados com a jararagina, cujo domínio metaloproteinase foi inativado pelo composto 1,10-fenantrolina, (Jar-Phe).

Gallagher e colaboradores (2005) ao injetarem 5 µg de jararagina diluída em 100 µL de salina no músculo gastrocnêmico de camundongos CD-1, observaram um acúmulo de leucócitos e eritrócitos provenientes da ação hemorrágica do domínio catalítico, no espaço intersticial. Nos tempo de 1 hora e 3 horas após a injeção da molécula, secções do músculo gastrocnêmico foram dissecadas e analisadas pela técnica de PCR em tempo real, analisando as diferenças de expressão de importantes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Os dados revelaram um aumento nos níveis de transcritos primários de todos os componentes analisados, dentre eles da citocina TNF- α e das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2.

Outras desintegrinas também apresentam efeitos semelhantes sobre o recrutamento de neutrófilos, dentre elas a Alternagina-C extraída da peçonha de *Bothrops alternatus*, que também apresenta maior afinidade de interação pela integrina $\alpha_2\beta_1$, ligando-se a esta pelo mesmo motivo adesivo ECD e apresentando 92% de homologia em sua estrutura com a JAR-C. Em um estudo *in vitro*, Mariano-Oliveira e colaboradores (2003) demonstraram o efeito positivo desta molécula sobre o recrutamento destes leucócitos, envolvendo alterações no citoesqueleto celular e fosforilação das vias FAK, PI3K, MAPK e Erk-2.

Coelho e colaboradores (2004) demonstraram *in vitro* o efeito quimiotático e a capacidade de ativação sobre neutrófilos humanos da desintegrina jararastatina, efeitos mediados pela interação desta molécula com a integrina $\alpha_m\beta_2$, através do motivo de ligação RGD. Demonstraram também a capacidade desta molécula em retardar a apoptose neste tipo celular por translocação de Erk-2 para o núcleo.

Durante a fase crônica da resposta inflamatória, o infiltrado celular anteriormente constituído principalmente por leucócitos polimorfonucleares, passa a ser substituído por monócitos recrutados da corrente sanguínea que ao chegarem ao sítio da inflamação se diferenciam em macrófagos. Estes por sua vez são dotados de uma plasticidade fenotípica, que garante aos mesmos o desempenho de suas diferentes funções ao longo da resposta inflamatória, potencializando-a e auxiliando em sua resolução e reparo, segundo o perfil de expressão das citocinas liberadas por estas células (HASKÓ & PACHER 2012; SICA & MANTOVANI, 2012).

Em nosso estudo também avaliamos este tipo celular, sendo observados efeitos significativos dos tratamentos com as doses de 200 ng e 2000 ng, capazes de aumentar a concentração de N-acetil- β -D-glicosaminidase, representativa da atividade de macrófagos, e também dos níveis da citocina CCL2/JE/MCP-1, principal quimiocina para o recrutamento e ativação de monócitos.

Oliveira e colaboradores (2015) constataram em modelo de reparo tecidual, induzido por hérnias incisionais em ratos Wistar, tratados com aplicação tópica de DisBa-01 em solução estéril de PBS (0,5 mg/Kg), um aumento do número de células mononucleares pela estimulação da migração de macrófagos e fibroblastos.

Costa e colaboradores (2002) registraram em modelo de bolsas de ar em camundongos Balb/c os efeitos tanto da jararagina, quanto da jararagina com seu domínio proteolítico inativado pelo composto 1,10-fenantrolina, sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade de ar. Seus resultados demonstraram um aumento de 300% na quantidade de leucócitos no grupo tratado com a jararagina em comparação ao grupo controle tratado com PBS, sendo observado um aumento de cinco vezes na quantidade de neutrófilos e duas vezes na quantidade de monócitos e macrófagos. No grupo tratado com a jararagina inativada observou-se um aumento de 200% do número de leucócitos quando comparados ao grupo controle. Nesse mesmo estudo constataram a capacidade pró-inflamatória da jararagina como dependente da ativação *in situ* de macrófagos, sendo esta capacidade independente da presença do seu domínio catalítico, que, no entanto, é capaz de potencializá-la.

Como descrito anteriormente, durante a fase resolutiva da inflamação, macrófagos da subpopulação M2 auxiliam na secreção de citocinas que dão início ao processo de angiogênese necessária a esta etapa, como também a processos em cronificação (LIU et al., 2014). Trata-se de um fenômeno biológico de formação de novos vasos, que têm início com a troca de um estado de quiescência das células endoteliais para um fenótipo angiogênico, em uma sequência de eventos decorrentes do balanço entre moléculas angiogênicas e anti-angiogênicas (VARRICCHI et al., 2015, RIBATTI, NICO & CRIVELLATO, 2009; NEVE et al., 2014).

Nesse trabalho avaliamos também os efeitos da Jararagina-C sobre a angiogênese, segundo parâmetros bioquímicos e morfológicos. Nossos resultados não demonstraram diferenças entre os grupos que receberam os tratamentos com as doses de Jararagina-C e o grupo controle tratado com salina, tanto para a quantificação bioquímica do conteúdo de hemoglobina, quanto para a contagem total de vasos sanguíneos. No entanto, os tratamentos

com as duas doses maiores apresentaram um aumento da concentração da citocina VEGF, citocina pró-angiogênica, capaz ainda de estimular a permeabilidade vascular. Em sua grande maioria os estudos realizados com as desintegrinas utilizaram de moléculas cujo motivo adesivo RGD possuía como principal alvo as integrinas $\alpha_v\beta_3$, sendo descritas como potentes inibidores da angiogênese (CALVETE, 2013).

Cassini-Vieira e colaboradores (2014) demonstraram neste mesmo modelo de implante subcutâneo, a capacidade anti-angiogênica da desintegrina recombinante DisBa-01, capaz de modular negativamente todos os parâmetros avaliados bioquimicamente e morfologicamente. Por sua vez, Oliveira e colaboradores (2015) trabalhando com esta mesma desintegrina em um modelo de reparo tecidual induzido, demonstraram um aumento da proliferação vascular, atribuída a uma maior quantidade do número de macrófagos e fibroblastos no local da lesão. Ribeiro e colaboradores (2014) demonstraram *in vitro* em cultura de monócitos/macrófagos estimulados com DisBa-01, um aumento da concentração de VEGF, que não foi observado pela estimulação da integrina $\alpha_v\beta_3$ pela vitronectina, sugerindo diferenças na resposta da produção de mediadores angiogênicos entre estes compostos.

Rabelo e colaboradores (2015), também neste modelo, demonstraram os mesmos efeitos anti-angiogênicos para camundongos tratados com Alternagina-C, cujo motivo adesivo ECD e a integrina alvo $\alpha_2\beta_1$ são os mesmos de nossa molécula em estudo. No entanto, trabalhos anteriores mostram um efeito dúbio desta desintegrina sobre o processo angiogênico. Ramos e colaboradores (2007) demonstraram uma capacidade de modulação dose-dependente da proliferação de células HUVEC em tampão matrigel, onde baixas concentrações (10 nM) eram capazes de estimular esse efeito e o oposto ocorria quando em altas concentrações (500 nM).

Sant'ana e colaboradores (2008) demonstraram em modelo de reparo tecidual, um aumento da expressão de VEGF de maneira também dose-dependente e relacionada ao tempo de aplicação do tratamento, onde se observou uma queda dos níveis desta citocina ao longo dos sete dias de tratamento no grupo controle e o efeito oposto nos grupos tratados com baixas concentrações (<100 ng) de ALT-C.

Pesquisas realizadas por Tanjoni e colaboradores (2005), mostraram que a Jararagina, metaloproteinase precursora da Jararagina-C, era capaz de induzir a apoptose nas células endoteliais por meio de alterações do citoesqueleto de actina, pela redução da fosforilação de FAK e por alterações e aumento de proteínas apoptóticas, como a pró-caspase-3 e da proteína Bax. Baldo e colaboradores (2015) relataram as mesmas observações sobre os efeitos da

Jararagina em células HUVEC, alterando a composição da matriz em que estas células eram cultivadas, percebendo diferenças no número de células que entravam em apoptose, indicando os efeitos que os componentes da matriz extracelular exercem sobre o comportamento destas células.

Apesar das diferenças de resultados encontrados na literatura, em nosso modelo, não obtivemos efeitos conclusivos sobre o papel da Jararagina-C no processo de angiogênese. A persistência de um quadro inflamatório é capaz de levar a cronificação deste processo, onde são secretadas maiores quantidades de citocinas pró-angiogênicas levando a formação de novos capilares sanguíneos que sustentam esse processo. No entanto, pelos dados levantados em literatura, vimos os efeitos negativos de sua molécula precursora sobre a sobrevivência das células endoteliais, em seu trabalho Baldo e colaboradores (2015) sustentam a capacidade dos domínios *desintegin-like* e *cisteín-rich* em contribuir para que o domínio catalítico exerça sua função, ou seja, leve a um quadro de hemorragia.

A resolução da inflamação é direcionada pela *downregulation* de mediadores pró-inflamatórios, a reconstituição da permeabilidade microvascular, contribuindo para cessar as quimiocinas locais, a síntese de mediadores anti-inflamatórios, bem como a apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório (SERHAN et al., 2013). A matriz extracelular densa, que no inicio foi depositada ao acaso, se encontra em processo de remodelamento, com o objetivo de recuperar arquitetura inicial do tecido lesionado, e todo esse processo é devido ao fino e delicado balanço entre a degradação e a agregação de colágeno na matriz extracelular (HINZ, 2007; ULRICH et al, 2007).

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos da Jararagina-C sobre o processo de remodelamento tecidual, avaliamos a deposição de colágeno solúvel e total e os níveis da citocina pró-fibrogênica TGF- β 1, capaz de estimular os fibroblastos a produzirem a matriz. Nossos resultados revelaram um aumento da concentração de colágeno solúvel avaliado bioquimicamente pela formação do complexo colágeno-Picrossirius red, nas doses de 20 ng e 200 ng, não sendo observado o mesmo comportamento para a avaliação histológica.

Sant'ana e colaboradores (2011) demonstraram *in vivo* em um modelo de reparo tecidual em ratos, utilizando a Alternagina-C nas doses de 10 ng, 60 ng e 100 ng, efeitos semelhantes sobre a deposição de colágeno, constatando após a diferenciação das fibras de colágeno tipo I e tipo III, um aumento da deposição para ambos os tipos de fibras. Neste mesmo estudo demonstraram um aumento da densidade de fibroblastos produzido pelo tratamento com a Alt-C. Os fibroblastos são importantes células no reparo tecidual e

participam ativamente na cicatrização de feridas, pois secretam um matriz provisória inicialmente e vários fatores de crescimento indispensáveis para o progresso do reparo tecidual (ELLIS et al., 2007).

Rabelo e colaboradores (2015) estudaram os efeitos da ALT-C sobre o mesmo modelo de implante sintético, demonstrando por técnicas bioquímicas e histológicas o aumento da deposição de colágeno pela aplicação intra-implante de 1000 ng desta desintegrina. O mesmo efeito foi acompanhado por um aumento da concentração da citocina TGF- β 1, para a mesma dose, quando comparada ao grupo controle.

Curiosamente, não foram percebidas alterações para os níveis da citocina TGF- β 1, quando comparamos estas doses em relação ao grupo controle, o que pode indicar que as ações da Jararagina-C sobre a deposição do colágeno ocorra de maneira independente da ação desta citocina, provavelmente pela ativação de vias de sinalização mediadas pela interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$ nos fibroblastos, alterando a expressão gênica para o colágeno. Ainda com relação aos níveis de TGF- β 1, nossos resultados mostraram uma redução significativa na concentração desta citocina nos implantes tratados com a dose de 2000 ng, esta redução pode indicar a persistência de um quadro pró-inflamatório, corroborado por nossos dados anteriores, onde o tratamento com a Jararagina-C apresenta maiores concentrações da citocina pró-inflamatória TNF- α e maiores concentrações de enzimas e quimiocinas relacionadas à células do infiltrado inflamatório.

Esse trabalho é o primeiro a mostrar os efeitos da Jararagina-C 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 características que auxiliam na compreensão da participação desta *desintegrin-like* no processo de envenenamento.

6. Conclusões

Em nosso trabalho avaliamos os efeitos da Jararagina-C, isolada do veneno bruto de *Bothrops jararaca*, formada a partir do processo de autólise da molécula de Jararagina, cuja estrutura primária não apresenta o domínio metaloproteinase, restando apenas os domínios *desintegrin-like* e *cisteín-rich*. Observamos que a Jararagina-C apresenta a capacidade de modular componentes da resposta inflamatória induzida por implantes subcutâneos de uma matriz sintética, que por sua vez nos possibilita analisar eventos concomitantes (inflamação, angiogênese e reparo).

Nosso estudo demonstrou a capacidade dessa molécula em sustentar e amplificar o processo inflamatório, alterando, inclusive, alguns componentes chave da angiogênese e do reparo tecidual, de modo a favorecer a resposta inflamatória.

Estes dados nos auxiliam, não apenas a compreender melhor os diferentes efeitos da associação de moléculas junto aos receptores do tipo integrina frente a processos inflamatórios e eventos a estes associados, como também possibilitam um melhor esclarecimento sobre o papel das desintegrinas no processo de envenenamento.

7. Referencial Bibliográfico

AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, vol. 6, n (4), pp. 274-281, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>.

ALAM, N., et al. The integrin-growth factor receptor duet. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 213, pp. 649–653, 2007. <https://doi.org/10.1002/jcp.21278>.

ANDRADE, S. P.; FAN, T. P. D.; LEWIS, G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British Journal of Experimental Pathology**, vol. 68, n (6), pp. 755-766, 1987.

ANDRADE, S. P., et al. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvascular Research**, vol 54, pp. 253-261, 1997. <https://doi.org/10.1006/mvre.1997.2047>.

ARAÚJO F. A., et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-a and TGF-b1. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 64, pp. 29-34, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.003>.

ARAÚJO, F. A., et al. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, vol 38, pp. 262-268, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05496.x>.

ASKARI, J. A., et al. Linking integrin conformation to function. **Journal of cell science**, vol. 122, pp. 165–170, 2009. <https://doi.org/10.1242/jcs.018556>.

ARROYO, A. G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular research**, vol. 86, n. 2, pp. 226-235, 2010. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq049>.

BALDO, C., et al. Jaraghagin disruption of endothelial cell anchorage is enhanced in collagen enriched matrices. **Toxicon**, vol. 108, pp. 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.016>.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymology**, vol. 162, pp. 327-334, 1988. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62087-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62087-8).

BOURNAZOU, I., et al. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 119, pp. 20-32, 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI36226>.

BRADLEY, P. P., et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>.

BURG, N.; PILLINGER, M. H. The neutrophil: Function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, vol. 99, n. (1), pp.7-17, 2001. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5007>.

CAMPOS, P. P., et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyetherpolyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, vol. 21, n. 12, pp. 1263-1270, 2006. <https://doi.org/10.14670/HH-21.1263>.

CALVETE, J. J. Structure-function correlations of venom desintegrins. **Current Pharmaceutical of Design**, vol. 11, pp. 829 – 835, 2005. <https://doi.org/10.2174/1381612053381783>.

CALVETE, J. J., et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, vol. 45, pp. 1063 – 1074, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, vol. 62, pp. 40–49, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.005>.

CASSINI-VIEIRA, P., et al. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge induced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicon**, vol. 92, pp. 81-89, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007>.

CASSINI-VIEIRA, P., et al. iNOS Activity Modulates Inflammation, Angiogenesis and Tissue Fibrosis in Polyether-Polyurethane Syntetic Implants. **Mediators of inflammation**, vol. 2015, pp. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/138461>.

CLISSA, P. B., et al. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, vol. 47, n. 5, pp. 591-596, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.001>.

COELHO, A. L, et al. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Experimental Cell Research**, vol. 292, n. 2, pp. 371-384, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.09.013>.

COSTA, E. P., et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, vol. 26, n. 1, pp. 13-17, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1014465611487>.

COSTA, E.; SANTOS, M.; COSTA, E. P. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model. **Toxicon**, vol. 44, pp. 861-870, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.009>.

DALLI, J., et al. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. **Blood**, vol. 112, pp. 2512-2519, 2008. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140533>.

DE SMET, F., et al. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 29, pp. 639-649, 2009. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185165>.

ELLIS, I. R.; SCHOR, A. M.; SCHOR, S. L. EGF and TGF-alpha motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms. **Experimental cell research**, vol. 313, n. 4, pp. 732-741, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.016>.

FERRAZ, C. R., et al. A. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF_B in mice. **Toxicon**, vol. 103, pp. 119-128, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.024>.

FRANCESCHI, N., et al. Integrin traffic – the update. **Journal of cell science**, vol. 128, n (5), pp. 839-852, 2015. <https://doi.org/10.1242/jcs.161653>.

FOUGEROLLES, A. R., et al. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. **Journal of Clinical Investigations**, vol. 106, n. 5, pp. 839-852, 2000. <https://doi.org/10.1172/JCI7911>.

FOX, J. W., et al. **Role of Discovery Science in Toxinology: Examples in Venom Proteomics**. In: Menez, A. Ed: Wiley, New York, pp. 97–106, 2002.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Febs Journal**, vol. 275, n. 12, pp. 3016-3030, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>.

FOX, S., et al. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of Innate Immunity**, vol. 2, pp. 216–227, 2010. <https://doi.org/10.1159/000284367>.

GALLAGHER, P., et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 441, pp. 1- 15, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.007>.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N. R. Inflammation and immunity. **British Journal of Anaesthesia**, vol. 3, pp 54-58, 2003. <https://doi.org/10.1093/bjacepd/mkg014>.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, vol. 5, pp. 953–964, 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.

GOODMAN, S. L.; PICARD, M. Integrins as therapeutic targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 33, n. 5, pp. 405-412, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.002>.

HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. Arteriosclerosis, **Trombosis and Vascular Biology**, vol. 32, n (4), pp. 865-869, 2012.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226852>.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 127, n. 3, pp. 526-537, 2007.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>.

HU, D. E., et al. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. **Laboratory Investigation**, vol. 72, n. 5, pp.601-10, 1995.

HUANG, J., et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 99, pp. 1-8; 2016.
<https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0615-256R>.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and MS/MS analysis. **Proteomics**, vol. 4, 327–338, 2004.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200300628>.

KAMIGUTI, A.S., et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. **Toxicon**, vol. 29, pp. 961–972, 1991.
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90079-7).

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, vol. 43, n. (1–3), pp. 25–61, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8049-6>.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, vol. 209, n (2), pp. 139-151, 2011. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>.

LASKIN, D. L. Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces. **Chemical Research in Toxicology**, vol. 22, n (8), pp. 1376-1385, 2009. <https://doi.org/10.1021/tx900086v>.

LIU, S. T., et al. Src as the link between inflammation and cancer. **Frontiers in Physiology**, vol. 416, n (4), pp. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00416>.

LU, P., et al. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 3, pp. a005058, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>.

MACÊDO, J. K. A.; FOX, J. W.; CASTRO, M. S.; Disintegrins from Snake Venoms and their Applications in Cancer Research and Therapy. **Current Protein and Peptide Science**, vol. 16, pp. 532-548, 2015. <https://doi.org/10.2174/138920371666150515125002>.

MANTOVANI, A., et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, vol. 11, pp. 519-531, 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.

MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, vol. 62, pp. 91 – 95, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.02.007>.

MARCINKIEWISK, C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 45, pp. 1974 – 1986, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.009>.

MAZZONE, M., et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. **Cell**, vol. 136, pp. 839–851, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.020>.

MEDZHITOY, R. Inflammation 2010: New adventures of an Old Flame. **Cell**, vol. 140, pp. 771 – 776, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

MEDZHITOY, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, pp. 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.

MENDES, J. B., et al. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvascular Research**, vol. 78, pp. 265-71, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.08.008>.

MARIANO-OLIVEIRA, A., et al. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **European Journal of Biochemistry**, vol. 270, n. 24, pp. 4799-4808, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03867.x>.

MINEA, R. O., et al. Vicrostatin - an anti-invasive multi-integrin targeting chimeric disintegrin with tumor anti-angiogenic and pro-apoptotic activities. **PLoS ONE**, vol. 5, n (6), e 10929, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010929>.

MONTENEGRO, C. F., et al. Blocking v 3 integrin by a recombinant RGD desintegrin impairs VEGF, signaling in endothelial cells. **Biochimie**, vol. 94, pp. 1812 – 1820, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.020>.

MORRISON, C. J., et al. M. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 21, pp. 645–653, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.06.006>.

MOURA-DA-SILVA, A. M., et al. Evidence for heterogenous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing snake venom variability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 409, pp. 395 – 401, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00598-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00598-2).

MOURA-DA-SILVA, A. M., et al. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from Bothrops jararaca venom. **Thrombosis Research**, vol 102, n. 2, pp. 153-159, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00216-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00216-X).

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **Immunity**, vol. 41, n (5), pp. 694-707, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>.

NEVE, A., et al. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. **BioMed Research International**, pp. 1- 10, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/756078>.

O'CONNOR, C.; NICHOL, A. Inflammation, immunity and allergy. **Anaesthesia**, vol. 16, n (7), pp. 328-333, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.05.001>.

OLIVEIRA, C. R., et al. Effects of blocking v 3 integrin by a recombinant RGD disintegrin on remodeling of wound healing after induction of incisional hernia in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, vol. 30, n. 2, pp. 134-142, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502015002000008>.

PAINÉ, M. J., et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 267, n. 32, pp. 22869-22876, 1992.

PEREIRA, N. B., et al. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. **Toxicon**, vol. 59, pp. 672-679, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.005>.

PERES, L. A. B., et al. Biomarkers of acute kidney injury. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, vol. 35, n. 3, pp. 229-236, 2013. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>.

PHILLIPS, C. L., et al. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney International**, vol.62, n. 2, pp. 383-391, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00451.x>.

PLUNKETT, M. L.; HAILEY, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory Investigation**, vol. 62, n. 4, pp. 510-517, 1990

PORCHERAY, F., et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 142, pp. 481–489, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x>.

SOEHNLEIN O, LINDBOM L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol 10, pp. 427-439, 2010
<https://doi.org/10.1038/nri2779>.

RABELO, Luis Fernando Gonçalves. Avaliação da atividade da Alternagina - C na inflamação crônica em camundongos. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RAMOS, O. H., et al. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 461, n. 1, pp. 1-6, 2007
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.021>.

RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, vol. 35, n (4), pp.445–55, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2011.09.004>.

RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELLATO, E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. **Angiogenesis**, vol. 12, n (1), pp. 101–111, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s10456-008-9125-1>.

RIBEIRO, L. C. A., et al. Recombinant disintegrin targets (v) (3) integrin and leads to mediator production. **Cell Adhesion & Migration**, vol. 8, n. 1, pp. 60–65, 2014.
<https://doi.org/10.4161/cam.27698>.

ROCHA, L. T., et al. Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. **Life Science**, vol. 79, n (5), pp. 499-505, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.027>.

ROY, R.; ZHANG, B.; MOSES, M. A. Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis. **Experimental Cell Research**, vol. 312, pp. 608-622, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.022>.

SANT'ANA, E. M., et al. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 479, n. 1, pp. 20-27, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.07.030>.

SANT'ANA, E. M., et al. Rat skin wound healing induced by alternagin-C, a disintegrin-like, Cys-rich protein from Bothrops alternatus venom. **International Wound Journal**, vol. 8, n. 3, pp. 245-252, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00776.x>.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, vol. 6, pp. 1191–1197, 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1276>.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 122, n (3), pp. 787-795, 2012.
<https://doi.org/10.1172/JCI59643>.

SOROKIN, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol. 10, n (10), pp. 712-73, 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2852>.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol. 10, pp. 427- 439, 2010.
<https://doi.org/10.1038/nri2779>.

TAKEDA, S., et al. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **EMBO Journal**, vol. 25, 2388–2396, 2006.
<https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601131>.

TANJONI, I., et al. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, vol. 10, n. 4, pp. 851-861, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-2945-1>.

TANJONI, I., et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha₂beta₁ integrin and collagen. **Toxicon**, vol. 55, n (6), pp.1093-1099, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.010>.

TEIXEIRA, T. L., et al. V. Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific Reports**, vol. 5, pp. 16877, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16877>.

TIWARI, S., et al. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. **Journal of cell science**, vol. 124, pp. 1672–1680, 2011. <https://doi.org/10.1242/jcs.084483>.

VAN DEN BERG, J. M., et al. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 69, pp. 467-473, 2001. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.3.467>.

USAMI, Y., et al. A 28-kDa Protein with Disintegrin-like Structure (Jararhagin-C) Purified from Bothrops jararaca Venom Inhibits Collagen- and ADP-Induced Platelet Aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 201, n. 1, pp. 331-339, 1994. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1706>.

ULRICH, M. M., et al. Expression profile of proteins involved in scar formation in the healing process of full-thickness excisional wounds in the porcine model. **Wound repair and regeneration**, vol. 15, n. 4, pp. 482-490, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00255.x>.

VAN HINSBERGH, V. W. M.; KOOLWIJK, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovascular Research**, vol. 78, n (2), pp. 203–212, 2008. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm102>.

VARRICCHI, G., et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory skin disorders. **Journal of the American Academy of Dermatology**, vol. 73, n (1), pp. 144-153, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.03.041>.

ZELANIS, A., et al. A Transcriptomic View of the Proteome Variability of Newborn and Adult Bothrops jararaca Snake Venoms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol.6, n(3), e1554, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001554>.

ZELANIS, A., et al. Proteomic identification of gender molecular markers in Bothrops jararaca venom. **Journal of Proteomics**, vol. 139, pp. 26-37, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.030>.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, vol. 214, pp. 161–178, 2008. <https://doi.org/10.1002/path.2284>.

ZWEERS, M. C., et al. Integrin 2 1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 127, pp. 467-478, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700546>.

Anexos:



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 015/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 158/13**

Projeto Pesquisa: “Avaliação da atividade da Jararagina-C na angiogênese inflamatória em camundongos”.

Pesquisador Responsável: Fernanda de Assis Araújo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 20 de Março de 2014.


Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU