



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica



Bruno Antonio Ferreira

Efeitos do tratamento intradérmico com a jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos.

Uberlândia-MG

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Efeitos do tratamento intradérmico com a jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos.

**Aluno: Bruno Antonio Ferreira**

**Orientador: Fernanda de Assis Araújo**

**Co-orientador: Patrícia Bianca Clissa**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**

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

---

F383e  
2020      Ferreira, Bruno Antonio, 1990-  
            Efeitos do tratamento intradérmico com a jararagina-C, uma proteína  
            tipo-disintegrina isolada [recurso eletrônico] : da peçonha de *Bothrops*  
            *jararaca*, sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos /  
            Bruno Antonio Ferreira. - 2020.

Orientadora: Fernanda de Assis Araújo.

Coorientadora: Patrícia Bianca Clissa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5542>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Fernanda de Assis, 1976-, (Orient.). II. Clissa,  
Patrícia Bianca, 1971-, (Coorient.). III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV.  
Título.

CDU: 575

---

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico, nº 03/2020, PPGGB.				
Data:	Dezesseis de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	13:05h
Matrícula do Discente:	11623GBI010				
Nome do Discente:	Bruno Antônio Ferreira				
Título do Trabalho:	Efeitos do tratamento intradérmico com a jararagina-C, uma proteína <i>tipo-disintegrina</i> isolada da peçonha de <i>Bothrops jararaca</i> , sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos efeitos da jararagina-C, uma toxina tipo-desintegrina, na cicatrização de feridas em camundongos.				

Aos dezesseis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 09:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup>. Lucíola da Silva Barcelos, Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Dr.<sup>ª</sup>. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo e Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup>. Fernanda de Assis Araújo, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup>. Fernanda de Assis Araújo, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). 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 (a):

\_A\_PROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda de Assis Araujo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/12/2020, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/12/2020, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Henrique da Silva, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucíola da Silva Barcelos, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Coordenador(a)**, em 16/12/2020, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2339932** e o código CRC **C30DBBD1**.

## AGRADECIMENTOS

O término deste doutorado não encerra apenas mais um passo de minha trajetória acadêmica, mas marca também o fim de uma formação junto à Universidade Federal de Uberlândia, iniciada ainda em 2009, quando entrei para o curso de Ciências Biológicas. Daquela época até aqui, conheci muitas pessoas que, com certeza, contribuíram para minha formação, tanto profissional como pessoal. Houve obstáculos, momentos que me fizeram repensar sobre a escolha de ser um pesquisador e, é claro, momentos que me fizeram questionar da minha capacidade. Entretanto, ao chegar até aqui, percebo que não são às dificuldades que nos apegamos, mas sim às alegrias e às pequenas vitórias após cada desafio vencido, momentos estes compartilhados, vividos ou proporcionados por várias das pessoas a quem agradeço neste momento.

Agradeço à Professora Dra. Fernanda de Assis Araújo, quem me recebeu pela primeira vez em 2014 e que hoje, além de minha orientadora, se tornou uma grande amiga. Agradeço por ter confiado a mim a execução deste e de outros projetos sob sua orientação. Agradeço por sempre ter a disponibilidade de ficar quase uma hora ao telefone para discutir resultados, discutir futuros projetos, focar, discutir sobre problemas pessoais ou para me animar, depositando em mim uma confiança revigorante. Obrigado por tudo que me ensinou até aqui.

Agradeço à minha família, especialmente meus pais Ari Fernando Ferreira e Edimari Aparecida Varussa Ferreira, e meu irmão Igor Fernando Ferreira, que sempre me incentivaram e me apoiaram para que eu pudesse chegar até aqui. Sempre com muito amor, paciência e união.

Agradeço ao meu namorado, Leonardo, por fazer parte da minha vida, por compartilhar dos meus projetos, planos e sonhos. Léo, te agradeço por tudo que você representa, por ser uma das melhores pessoas que já conheci e por poder estar ao seu lado neste momento.

Agradeço todo o corpo técnico e de docentes da Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. Em especial, gostaria de agradecer ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e a Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa, por proporcionarem as análises de PCR em tempo real utilizadas neste trabalho.

Agradeço também todos os demais professores, técnicos e funcionários que contribuíram para minha formação acadêmica, mas que não estão associados à Pós-graduação.

Agradeço aos meus amigos feitos no dia-a-dia do laboratório. Francielle, uma parceira de bancada que se tornou uma de minhas melhores amigas. Fran, te agradeço por todos os conselhos, todas as conversas, todos os experimentos e todas as “roubadas” que vivemos nessa UFU. Amanda, Léia, Mateus e Victor, agradeço pela amizade cultivada com vocês nesses últimos dois anos, vocês só me trouxeram alegrias. Agradeço por cada cafezinho, gargalhada e até mesmo as frustrações compartilhadas, tudo sempre foi mais fácil e divertido com vocês. Agradeço à toda equipe de técnicos do bloco 2A, Cris, Dani, Isa, Simone e Taís, não só pelo exercício de suas funções, mas pela amizade cultivada ao longo de vários anos. Assim como os demais amigos que fiz na fisiologia, vocês fizeram do bloco 2A uma segunda casa.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanham, conversam e me ensinam sempre um pouco mais a melhorar como pessoa e, assim, lutar por um mundo melhor, ou ao menos, para tornar o mundo ao meu redor um lugar especial.

Por fim, agradeço as agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo recurso financeiro utilizado na compra de reagentes e pela manutenção de todas as bolsas que tive até aqui.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

*(Isaac Newton)*

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o efeito da administração intradérmica da jararagina-C, uma proteína *tipo-disintegrina*, isolada da peçonha de *B. jararaca* e com afinidade pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , durante a cicatrização de feridas excisionais. Quatro lesões foram realizadas na região dorsal de camundongos da linhagem Swiss, com o auxílio de um punch de biópsia cirúrgico de 5 mm. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, cujos indivíduos foram diariamente tratados com injeções de 10  $\mu$ l de PBS (grupo controle) ou da toxina (200 ng), aplicados nas bordas da ferida. Dez animais, de cada um dos grupos experimentais, foram eutanasiados nos seguintes intervalos de tempo 1, 3, 7, 10 e 14 dias após a indução das lesões (totalizando 20 animais para cada intervalo). Após a eutanásia, as feridas e a pele do seu entorno foram removidas com o auxílio de um punch de biópsia de 8 mm, pesadas e processadas para análises bioquímicas, histológicas e de biologia molecular. As feridas tratadas com a jararagina-C apresentaram uma taxa de fechamento mais acelerada, acompanhada de uma rápida resolução da resposta inflamatória, com redução do infiltrado de neutrófilos, dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , CXCL-1 e CCL2/JE/MCP-1) e um acúmulo de macrófagos nos tecidos analisados. Observou-se também, nas lesões tratadas com esta proteína, uma maior expressão de genes associados ao fenótipo de macrófagos alternativamente ativados (M2), responsáveis pela resolução da resposta inflamatória e pela secreção de vários mediadores associados com as etapas subsequentes do reparo. Concomitantemente, a administração da toxina foi capaz de incitar a angiogênese nas feridas, elevando o conteúdo de hemoglobina, a densidade de novos vasos sanguíneos e a síntese de citocinas pró-angiogênicas (VEGF e FGF). Por fim, nas feridas dos grupos tratados, observamos ainda um aumento da deposição de colágeno nas feridas, acompanhado de níveis mais elevados da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1. Além disso, ao avaliarmos a organização e a maturação da matriz, por meio da diferenciação entre fibras de colágeno do tipo I e fibras de colágeno do tipo III, observamos que o tratamento com a jararagina-C, resultou em uma deposição precoce e mais elevada de fibras de colágeno do tipo I. Em conjunto, os dados sugerem que a administração da jararagina-C acelerou o fechamento das feridas excisionais, por meio da modulação de respostas importantes ao processo de cicatrização de feridas (ex.: inflamação, angiogênese e fibrogênese). Desta forma, este trabalho não só contribui para a elucidação dos efeitos ocasionados pela administração da jararagina-C, como também, para o aprofundamento do conhecimento sobre a sinalização mediada pela integrina  $\alpha_2\beta_1$  nos processos avaliados, permitindo o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de feridas cutâneas.

**Palavras-chave:** Cicatrização, feridas cutâneas, disintegrinas, jararagina, integrinas, peçonha.

## ABSTRACT

In this work, the effect of intradermal administration of jararhagin-C, a disintegrin-type protein, isolated from *B. jararaca* venom and with affinity for  $\alpha 2\beta 1$  integrin, was evaluated during the healing of excisional wounds. Four lesions were performed on the dorsal region of Swiss strain mice, with the aid of a 5 mm surgical biopsy punch. The animals were divided into two experimental groups, whose subjects were daily treated with injections of 10  $\mu$ l of PBS (control group) or of the toxin (200 ng), applied to the edges of the wound. Ten animals from each of the experimental groups, were euthanized at the following time intervals 1, 3, 7, 10 and 14 days after lesion induction (totaling 20 animals for each interval). After euthanasia, the wounds and skin around them were removed with the aid of an 8 mm biopsy punch, weighed and processed for biochemical, histological and molecular biology analysis. Wounds treated with jararhagin-C showed a faster rate of closure, accompanied by a rapid resolution of the inflammatory response, with a reduction in neutrophil infiltrate, levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , CXCL-1 and CCL2 / JE / MCP-1) and an accumulation of macrophages in the analyzed tissues. It was also observed, in the lesions treated with this protein, a greater expression of genes associated with the phenotype of alternatively activated macrophages (M2), responsible for the resolution of the inflammatory response and for the secretion of several mediators associated with the subsequent stages of repair. Concomitantly, the administration of the toxin was able to incite angiogenesis in the wounds, increasing the hemoglobin content, the density of new blood vessels and the synthesis of pro-angiogenic cytokines (VEGF and FGF). Finally, in the wounds of the treated groups, we also observed an increase in the collagen deposition in the wounds, accompanied by higher levels of the pro-fibrogenic cytokine TGF- $\beta$ 1. In addition, when evaluating the organization and maturation of the matrix, by differentiating between type I collagen fibers and type III collagen fibers, we observed that treatment with jararhagin-C resulted in an early and higher deposition of type I collagen fibers. Considering everything, the data suggest that the administration of jararhagin-C accelerated the closure of excisional wounds by modulating important responses to the wound healing process (e.g., inflammation, angiogenesis and fibrogenesis). Thus, this work not only contributes to the elucidation of the effects caused by the administration of jararhagin-C, but also to the deepening of knowledge about the signaling mediated by the integrin  $\alpha 2\beta 1$  in the evaluated processes, allowing the development of new therapies for the treatment of skin wounds.

**Keywords:** Healing, skin wounds, disintegrins, jararhagin, integrins, venom.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Alt-C** – Alternagina C

**ANOVA** – Análise de variância

**Arg1** – Arginase-1

**BSA** - Albumina de soro bovino

**B2M** - Beta-2 microglobulina

**CEUA** - Comissão de Ética na Utilização de Animais

**CXCL1** – Quimiocina motivo C-X-C ligante 1

**CCL2/JE/MCP-1** – Quimiocina motivo C-X-C ligante 2

**DAMPS** – Padrões moleculares associados ao dano

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**ELISA** - *enzyme-linked immunosorbent assay*

**EGF** – Fator de crescimento epidérmico

**E.P.M** – Erro padrão da média

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**FGF** – Fator de crescimento fibroblástico

**Fizz-1** - Proteína encontrada na zona inflamatória

**Hb** – Hemoglobina

**HGF** – Fator de crescimento dos hepatócitos

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico

**HTAB** - *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide*

**ICAM** – Molécula de adesão intercelular

**IFN** – Interferon

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**IL-1** – Interleucina 1

**IL-4** – Interleucina 4

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-13** – Interleucina 13

**iNOS** – Óxido nítrico sintetase 2

**Jar-C** – Jararagina-C

**Jar-Phe** – Jararagina inativada pelo agente quelante 1-10 fenantrolina

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MEC** – Matriz extracelular

**mg** - miligrama

**MMP** – metaloproteinase de matriz

**MPO** – Mieloperoxidase

**Mrc-1** - Mannose Receptor, C type 1

**mRNA** – RNA mensageiro

**NAG** – N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

**NaOH** – Hidróxido de sódio

**ng** - nanograma

**nmol** – nanomolar

**NETs** – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**O.D.** – Densidade óptica

**PAMPS** – Padrões moleculares associados ao patógeno

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-PCR** - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

**SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio

**SINAN** – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SVMPs** – Metaloproteinases da peçonha de serpentes

**svVEGF** – Fator de crescimento do endotélio vascular derivado da peçonha de serpentes.

**TGF- $\beta$ 1** – Fator de crescimento transformador beta 1

**Tgm2** – Transglutaminase 2

**TMB** - 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidine

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TIMP** - inibidores teciduais de metaloproteinases

**UFU** – Universidade Federal de Uberlândia

**VCAM** – Molécula de adesão vascular

**VEGF** – Fator de crescimento do endotélio vascular

**$\alpha$ SMA** –  $\alpha$ -actina de músculo liso

**$\mu$ l** - microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica do processo de cicatrização de feridas. _____	16
Figura 2– Eventos associados ao recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória. _____	18
Figura 3 - Representação esquemática dos 24 heterodímeros constituintes da família das integrinas e encontradas nos vertebrados. _____	22
Figura 4 – Representação gráfica das alterações conformacionais em uma integrina, induzidas por sinais do meio intracelular (sinalização inside-out). _____	23
Figura 5 - Representação esquemática do modelo proposto para a classificação das SVMPS, segundo a presença de determinados domínios em sua estrutura _____	26
Figura 6 – Estrutura tridimensional da SVMPS Jararagina. _____	27
Figura 7 – Modelo de feridas excisionais em camundongos. _____	34
Figura 8 – Representação gráfica do delineamento experimental utilizado. _____	35
Figura 9 - O tratamento com jararagina-C acelerou o fechamento das feridas excisionais. _____	43
Figura 10 - Cinética da síntese de citocinas pró-inflamatórias nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização _____	45
Figura 11 - Cinética do infiltrado de leucócitos nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização. _____	47
Figura 12- Cinética da concentração de mastócitos nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização. _____	48
Figura 13- A expressão relativa de genes associados ao fenótipo de macrófagos M1 é atenuada nas feridas excisionais tratadas com a jararagina-C. _____	49

Figura 14 - Genes associados ao fenótipo de macrófagos M2 encontram-se superexpressos nas feridas excisionais tratadas com a jararagina-C. _____	50
Figura 15 – Fotomicrografia das secções histológicas coradas com tricrômico de gomori, utilizada para quantificação de novos vasos sanguíneos _____	52
Figura 16 - Cinética dos parâmetros associados ao processo de angiogênese, avaliados após o tratamento com a jararagina-C, durante a cicatrização de feridas excisionais em camundongos _____	53
Figura 17 - Cinética dos parâmetros associados a deposição de colágeno, avaliados após o tratamento com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização. _____	55
Figura 18 – Fotomicrografias da deposição das fibras de colágeno do tipo I e das fibras de colágeno do tipo III, após o tratamento com a jar-C, durante a cicatrização de feridas excisionais. _____	56
Figura 19 - Análise da área de cicatrização das feridas quanto ao conteúdo de fibras de colágeno do tipo I e fibras de colágeno do tipo III _____	57
Figura A-1: Efeito do tratamento intradérmico com a toxinas Jar e Jar-Phe, durante a cicatrização de feridas excisionais. _____	81
Figura A-2: Perfil do infiltrado de leucocitário nas feridas de camundongos tratados com a Jar e a Jar-Phe, durante o processo de cicatrização. _____	82
Figura A-3: Cinética dos parâmetros associados ao processo de angiogênese, avaliados após o tratamento com as toxinas Jar e Jar-Phe, durante a cicatrização de feridas excisionais em camundongos. _____	83
Figura A-4: Cinética dos parâmetros associados a deposição de colágeno, avaliados após o tratamento com as toxinas Jar e Jar-Phe, durante o processo de cicatrização. _____	84

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 – <i>O processo de cicatrização de feridas.</i> .....	14
1.2 – Integrina $\alpha_2\beta_1$ e seu papel em processos associados ao reparo de feridas. ....	21
1.3 – A peçonha das serpentes e a jararagina-C .....	25
<b>2 – Objetivos</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 – Obtenção da peçonha .....	32
3.2 – Animais .....	32
3.3 – Modelo de cicatrização de feridas excisionais. ....	32
3.4 – Grupos experimentais e tratamento das feridas.....	34
3.5 – Dosagem de hemoglobina .....	36
3.6 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	36
3.7 - Avaliação da atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) .....	37
3.8 - Avaliação da produção de colágeno solúvel .....	37
3.9 - Dosagem de citocinas e quimiocinas .....	38
3.10 – RT-PCR.....	39
3.10.1 – Coleta do material para análises moleculares.....	39
3.10.2 – Extração do RNA .....	39
3.10.3 – Síntese de cDNA .....	40
3.10.4 – PCR em tempo real .....	40
3.11 – Análises Histológicas .....	41
3.12 – Análise estatística.....	42
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 O tratamento com a jararagina-C acelerou o fechamento das feridas cutâneas .....	43
4.2 - Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios durante o processo de cicatrização.....	44
4.3 - Avaliação do perfil de leucócitos nas feridas após o tratamento com jararagina-C .....	46
4.4 – O tratamento com a jararagina-C resultou em uma redução da expressão de genes associados a macrófagos M1 e um aumento da expressão de genes associados a macrófagos M2. ....	49
4.5 – O tratamento com a jararagina-C aumentou a angiogênese durante a cicatrização das feridas cutâneas. ....	51

4.6 – A deposição de colágeno, especialmente de fibras de colágeno do tipo I, foi aumentada nas feridas tratadas com a Jar-C.....	54
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>85</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – O processo de cicatrização de feridas.

Nos vertebrados a pele constitui uma importante estrutura de barreira, que protege os órgãos internos de danos mecânicos, da infecção por microrganismos, da radiação ultravioleta, das elevações de temperatura e da perda excessiva de água para o ambiente (PROKSCH, BRANDNER & JENSEN, 2008). A pele humana é constituída por camadas celulares agrupadas em duas regiões distintas, a epiderme e a derme. A epiderme é formada por um tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso e queratinizado, composto predominantemente por células denominadas de queratinócitos, que se encontram dispostos em camadas ou estratos. Na epiderme podemos observar ainda uma população de células basais em constante proliferação, presentes na camada germinativa, responsáveis pela renovação deste tecido (RIBEIRO, LEAL & JEUNON, 2017;). Subjacente a epiderme encontra-se a derme, formada por um tecido conjuntivo vascularizado. Outros tipos celulares também estão presentes neste tecido, como os fibroblastos, principais responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), e células com função imunológica, responsáveis pela identificação de patógenos e de possíveis danos teciduais (ex.: macrófagos, mastócitos e células dendríticas). Ainda na derme encontram-se a maioria das estruturas anexas a este órgão, como glândulas sebáceas e sudoríparas (ZOMER & TRENTIN, 2018; BOER *et al.*, 2016).

O contato direto deste órgão com fatores externos, torna a pele susceptível a uma série de mecanismos de injúria, que podem resultar em feridas cutâneas, levando à perda da homeostasia e propiciando uma porta de entrada a agentes patogênicos. (SORG *et al.*, 2017). Portanto, a capacidade dos organismos de reparar tecidos lesionados e assim, restaurar sua integridade e funcionalidade, é um requisito essencial para a sobrevivência junto ao meio em que vivem.

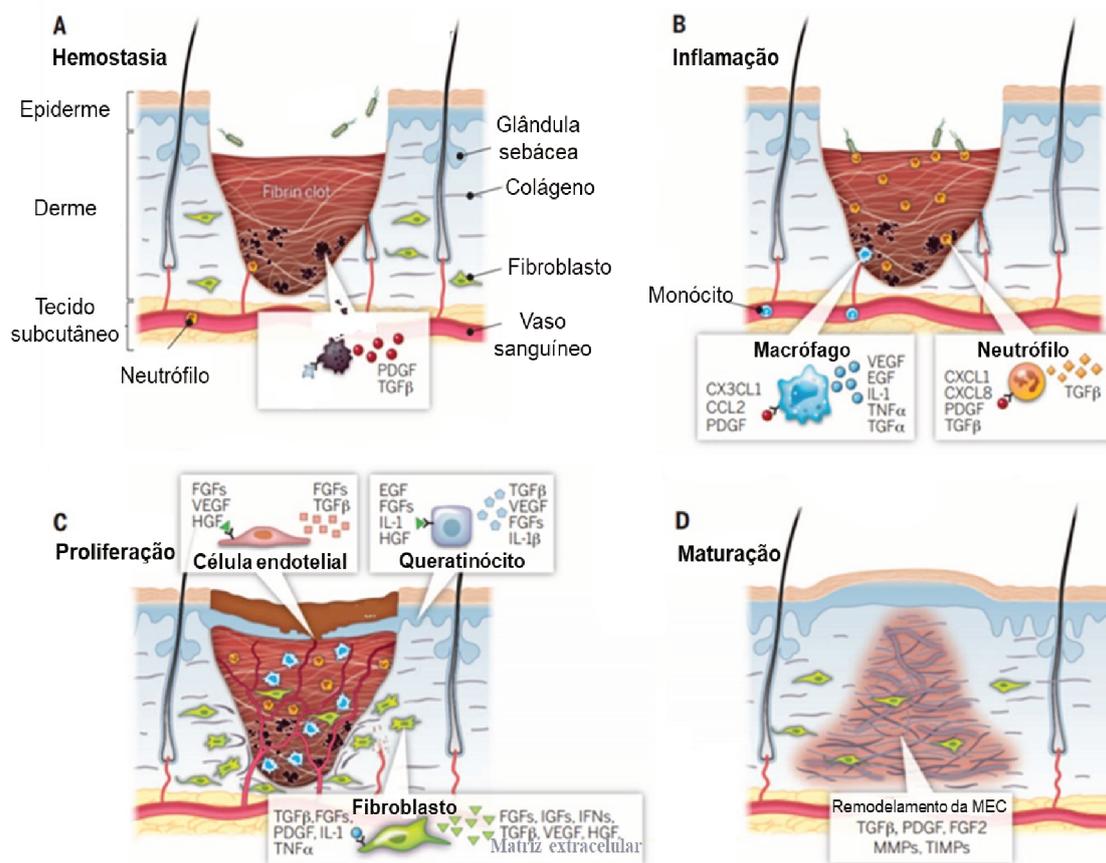
O processo de reparo tecidual pode ocorrer por meio da regeneração do tecido lesionado, a partir da proliferação de células parenquimatosas, que repovoarão o local da injúria, mantendo desta maneira a função tecidual. Em alguns órgãos, no entanto, o processo de reparo se dá pela substituição do tecido lesionado por uma matriz cicatricial, rica em fibras de colágeno. Este tipo de reparo, denominado de cicatrização, é o

predominante durante a restauração de feridas cutâneas em humanos adultos (ERICKSON & ECHEVERRI, 2018; MONAVARIAN, 2019).

### *1.1.1 – Fases do processo de cicatrização*

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, que envolve a ativação de uma diversidade de células, bem como a síntese e a secreção coordenada de mediadores químicos solúveis, dentre estes, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Embora os eventos que compõem a cicatrização se sobreponham no tempo e no espaço, este processo pode ser didaticamente dividido em três fases, que têm como objetivo restaurar parte da anatomia e da função deste tecido (SORG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Resumidamente, após a instalação de uma fase inflamatória inicial, que tem por objetivo a eliminação de restos teciduais e também de microrganismos patogênicos, segue-se uma fase denominada de proliferativa, marcada pela re-epitelização da ferida, pela migração e proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos, com a formação de um de tecido de granulação. Finalmente, em uma terceira fase, de maturação, observa-se o remodelamento da MEC, com a substituição de seus componentes (Figura 1) (BIELEFELD, AMINI-NIK, ALMAN, 2013; SUN, SIPRASHVILI & KHAVARI, 2014)



**Figura 1 – Representação gráfica do processo de cicatrização de feridas.**

Apesar de ocorrerem em sobreposição no tempo e no espaço, a cicatrização pode ser didaticamente dividida em 3 fases, orquestradas por diferentes tipos celulares e pela secreção de um amplo espectro de mediadores solúveis. 1 – Fase inflamatória que engloba os eventos da (A) hemostasia e da (B) inflamação; 2 – Fase proliferativa, representada em (C); 3 – Fase de maturação, representada em D. PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas; TGFβ – fator de crescimento transformante beta; VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular; EGF – Fator de crescimento epidérmico; IL-1 – interleucina 1; TNF-α – fator de necrose tumoral alfa; FGF – fator de crescimento fibroblástico; HGF – fator de crescimento dos hepatócitos; IFN – interferon; MMPs – metaloproteinases de matriz; TIMPs – inibidores teciduais de metaloproteinases. Fonte: imagem modificada de: SUN, B.K., SIPRASHVILI, Z., KHAVARI, P.A. *Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds*. Science, pp. 941–945, 2014.

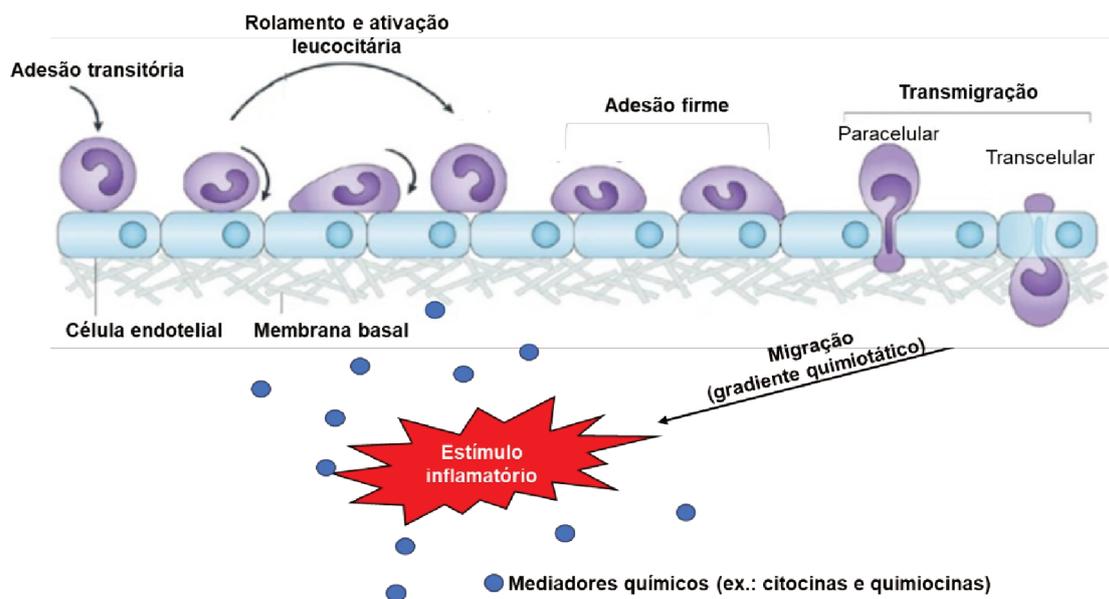
### 1.1.2 – Fase inflamatória

Imediatamente após uma injúria à pele, células presentes nos tecidos adjacentes a lesão, são capazes de identificar moléculas que sinalizam o dano aos componentes daquele local, ou ainda, a existência de microrganismos. Este reconhecimento é possível graças à presença de receptores que identificam os chamados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) ou aos patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV, 2008). Queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, mastócitos e células dendríticas, em resposta à ativação de tais receptores, passam a sintetizar citocinas, tais

como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferon-gama, quimiocinas (ex.: CXCL-1 e CCL2/JE/MCP-1) e substâncias vasoativas (ex.: histamina). Estes mediadores levam às alterações vasculares e aos eventos celulares, responsáveis pelo extravasamento de um fluido rico em proteínas plasmáticas (exsudato) e pelo recrutamento de leucócitos circulantes (O'CONNOR & NICHOL, 2015).

Como parte desta fase inflamatória, podemos observar ainda uma resposta vascular, com a ativação de fatores hemostáticos e a formação de um coágulo de fibrina, a fim de se evitar a perda excessiva de sangue pelos vasos lesionados (ENOCH & LEAPER, 2008). Além de evitar uma hemorragia, o coágulo de fibrina recém-formado servirá como uma matriz provisória à migração de células a partir das bordas da ferida para o seu centro (GONZALEZ *et al.*, 2016)

Após o reconhecimento de um insulto lesivo, os mediadores inflamatórios e as substâncias vasoativas liberadas pelas células residentes teciduais, ocasionam um aumento da permeabilidade vascular e a ativação das células endoteliais, que passam a expressar moléculas de adesão celular da família das selectinas (E-selectina, P-selectina e L-selectina), necessárias à adesão transitória dos leucócitos, durante o rolamento destes sobre a parede vascular (GERMOLEC *et al.*, 2018). O contato destas células com as citocinas e quimiocinas inflamatórias, provoca ainda uma alteração conformacional em receptores transmembrana da família das integrinas, que passam para um estágio de maior afinidade aos seus ligantes, presentes nas células endoteliais, gerando uma adesão forte a parede do vaso, necessária à diapedese (LEY *et al.*, 2007). Uma vez no espaço extravascular os leucócitos são atraídos ao sítio da lesão por meio de um gradiente quimiotático (Figura 2) (AHMED, 2011).



**Figura 2– Eventos associados ao recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória.**

Após as alterações vasculares, decorrentes da síntese de mediadores vasoativos pelas células sentinelas, os leucócitos se aproximam da parede do endotélio vascular e se aderem transitoriamente as células endoteliais. Após o rolamento pela parede vascular e a ativação leucocitária, ocorre a adesão firme, a transmigração e, em sequência, a migração em direção a um gradiente quimiotático de citocinas. Fonte: modificado de: LEY, K.; LAUDANA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, pp. 678-689, 2007.

Nas primeiras horas da resposta inflamatória há um grande acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório. O recrutamento destes leucócitos é direcionado pela secreção da quimiocinas, tais como a CXCL8, CXCL1 e CXCL2, que orientam o movimento destes em direção ao local da injúria (RIDIANDRIES, TAN & BURSILL, 2018). Os neutrófilos são responsáveis pela eliminação de microrganismos e de restos teciduais. Para isso, agem por meio (1) da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade no interior de seus grânulos azurófilos; (2) da fagocitose; (3) e da liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophils extracellular traps – NETs*), estruturas compostas por filamentos de cromatina, cobertos por histonas, proteínas citosólicas e proteases, que auxiliam na captura e eliminação de microrganismos (MANTOVANI *et al.*, 2011). Os neutrófilos apresentam um período de meia-vida curto e após poucos dias entram em apoptose, evento de suma importância para a estimulação da resposta inflamatória, com a liberação de mediadores que inibem o recrutamento de novos neutrófilos, como a Anexina-1 e a lactoferrina, esta última, ainda apresentando um potente efeito microbicida (CHEN, LV & PEI, 2013; BOURNAZOU *et al.*, 2009).

Após um período de 48-72 horas, o leito da ferida começa a ser povoado por macrófagos, oriundos principalmente do processo de diferenciação de monócitos recrutados a partir da circulação sanguínea (MEDZHITOV, 2010). Assim como os neutrófilos, os macrófagos também são responsáveis pela fagocitose de microrganismos e de restos celulares. A ativação deste tipo celular é um processo dinâmico e crítico ao reparo tecidual, devido à existência de um amplo espectro de subpopulações que variam de um fenótipo inflamatório clássico (M1) a um fenótipo resolutivo ou alternativo (M2) (SNYDER *et al.*, 2016). Os macrófagos da subpopulação M1 atuam principalmente nos processos de defesa, produzem um grande número de substâncias microbidas e citocinas pró-inflamatórias, exercendo desta maneira, efeitos anti-proliferativos e citotóxicos. Já os macrófagos da subpopulação M2 estão mais envolvidos com a resolução da resposta inflamatória (WYNN & VANELLA, 2016). São ativados por alguns mecanismo, tais como após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, processo conhecido como eferocitose, ou pela ação da interleucina-4 e interleucina-13 (SICA *et al.*, 2015). Macrófagos desta subpopulação apresentam uma síntese reduzida de citocinas inflamatórias e uma maior liberação de mediadores importantes para a resolução da inflamação, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), para a formação de novos vasos sanguíneos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e para a síntese e o remodelamento de uma nova matriz extracelular (TGF- $\beta$ 1) (WYNN & VANELLA, 2016).

### 1.1.3 – Fase proliferativa

A liberação de certos mediadores químicos, produzidos principalmente por macrófagos M2, estimula a migração e a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, a partir das bordas da ferida, e de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e adjacentes ao local da lesão (SNYDER *et al.*, 2016).

Durante a cicatrização, o processo de angiogênese é um fator importante para o progresso do reparo tecidual, pois cabe a esta neovascularização o fornecimento de oxigênio e de substratos energéticos às células presentes na lesão (GREAVES *et al.*, 2013). A angiogênese ocorre principalmente a partir da ativação, migração e proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes, processo conhecido como brotamento. Em resposta às citocinas e fatores de crescimento, dentre estes, o VEGF e o fator de

crescimento fibroblástico (FGF), liberados por células no local da lesão. As células endoteliais passam a sintetizar metaloproteinases, que permitem a degradação de sua membrana basal, assim como a invasão e a migração pela matriz extracelular, permitindo a ocupação de áreas anteriormente avascularizadas (CARMELIET & JEIN, 2011; POTENTE E CARMELIET, 2017). A insuficiência deste processo está associada a cronificação da cicatrização, como ocorre em feridas diabéticas e isquêmicas. No diabetes por exemplo, os altos níveis glicêmicos estão associados com a redução do diâmetro e do número de vasos recém-formados, com a instabilidade dos mesmos, a disfunção endotelial e a maior suscetibilidade à apoptose (OKONKWO & DIPIETRO, 2017).

Ainda nesta fase, a invasão do sítio da ferida por fibroblastos em migração e proliferação, leva à substituição gradual da matriz provisória, rica em fibrina e formada durante o processo de hemostasia, por um novo arcabouço, cujos componentes dão suporte aos eventos da angiogênese, a formação do tecido de granulação e a re-epitelização da ferida (GREAVES, 2013). O infiltrado de fibroblastos libera enzimas que degradam o coágulo de fibrina e o substitui por componentes da MEC, tais como colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Em um primeiro momento, a produção de colágeno caracteriza-se pela maior síntese e deposição de fibras de colágeno do tipo III, um colágeno ainda imaturo, menos resistente, porém capaz de fornecer um arcabouço de fácil migração celular (BAINBRIDGE, 2013).

Citocinas da família TGF- $\beta$  estão envolvidas com a estimulação da migração de fibroblastos e com a síntese dos componentes da MEC (LICHTMAN, OTERO-VINAS, FALANGA, 2016). Além disso, ao final da fase proliferativa, em resposta a estas citocinas, muitas destas células passam por um processo de diferenciação em miofibroblastos, agora caracterizados pela grande concentração de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) em seu citoplasma (LEASK & ABRAHAM, 2004). Esta diferenciação garante a capacidade de contração destas células, importante para o processo de contração das feridas, que aproxima as suas bordas e, em associação com a re-epitelização, permite o seu fechamento (HINZ, 2016).

#### *1.1.4 – Fase de maturação*

O último e mais longo estágio da cicatrização é a fase de maturação da ferida, marcada pela formação do tecido de cicatrização (WANG *et al.*, 2018). Durante esta etapa, macrófagos e fibroblastos presentes na área da ferida entram em apoptose, reduzindo a quantidade destas células junto ao tecido. Simultaneamente, observa-se a inibição do processo de angiogênese, com consequente regressão dos vasos recém formados, reduzindo o fluxo sanguíneo na região (ENOCH & LEAPER, 2008).

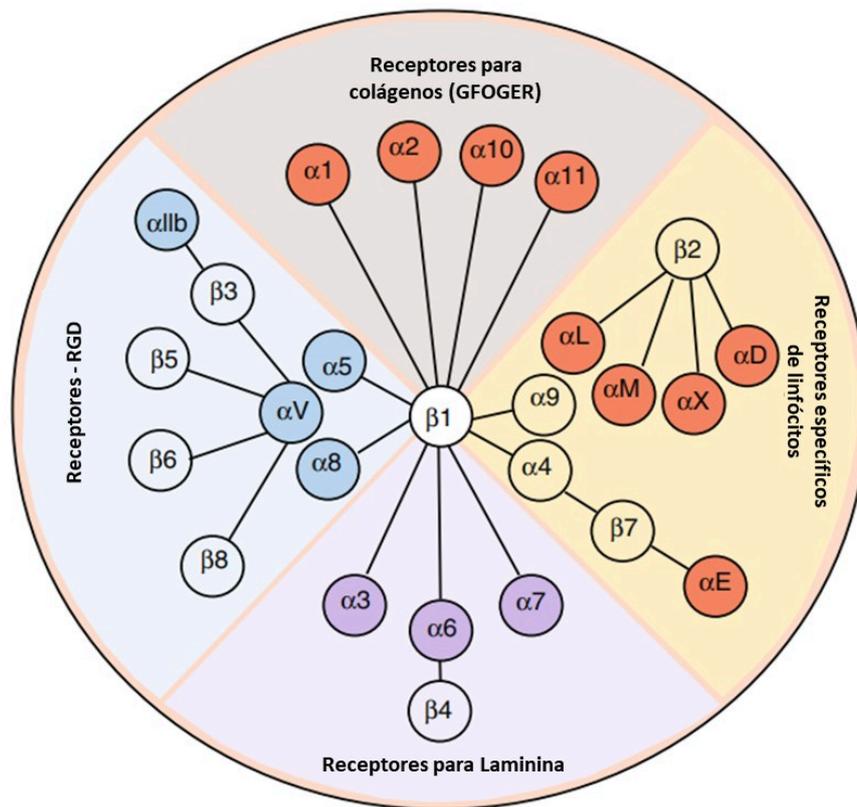
Outro evento importante durante a maturação é o remodelamento dos componentes da MEC, com substituição do colágeno tipo III, por um tipo de colágeno mais estável, o colágeno tipo I, que aumenta a resistência da cicatriz à tensão mecânica. O remodelamento da MEC é um processo dinâmico, controlado pela síntese de fatores pró- e anti-fibrogênicos e pelo balanço entre a secreção de metaloproteinases e de seus inibidores (BAUM & ARPEY, 2006; WANG *et al.*, 2018).

O reparo anormal de feridas resulta de desordens no remodelamento do tecido de granulação e pode levar a uma cicatrização hipertrófica ou fibrose (BERMAN, MADERAL & RAPHAEL, 2017). Além disso, quando o reparo ocorre de forma inapropriada, desencadeia-se uma resposta inflamatória crônica a qual pode levar ao retardo da cicatrização e isso representa um problema direto para o indivíduo, causando desconforto físico e/ou psicológico e demora na reabilitação, podendo até causar amputação de membros e morte por septicemia nos casos mais extremos (ZHAO *et al.*, 2016). Portanto, existe um grande interesse no estudo de moléculas/fármacos os quais possam modular o processo de cicatrização de feridas.

## 1.2 – Integrina $\alpha_2\beta_1$ e seu papel em processos associados ao reparo de feridas.

As integrinas são uma família de receptores heterodiméricos transmembrana, formadas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . Atualmente, tem-se o conhecimento de 24 diferentes integrinas expressas pelas células de mamíferos, constituídas pela combinação de uma das 18 subunidades  $\alpha$  e uma das 8 subunidades  $\beta$  já descritas (FU, WUANG & LUO, 2011). As integrinas são compostas por uma porção extracelular, formada de múltiplos domínios, uma região transmembrana e uma pequena cauda voltada para o espaço intracelular (FRANCESCHI *et al.*, 2015). A diversidade de possíveis combinações entre suas subunidades permite às integrinas a associação com vários dos

constituintes da MEC, tais como fibronectina, laminina e colágeno, assim como a ligação a diferentes receptores encontrados na superfície celular, dentre estes a molécula de adesão celular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (Figura 3). Dessa maneira, as integrinas regulam não apenas o contato das células à matriz extracelular, mas também participam da adesão célula-célula (BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, 2010).

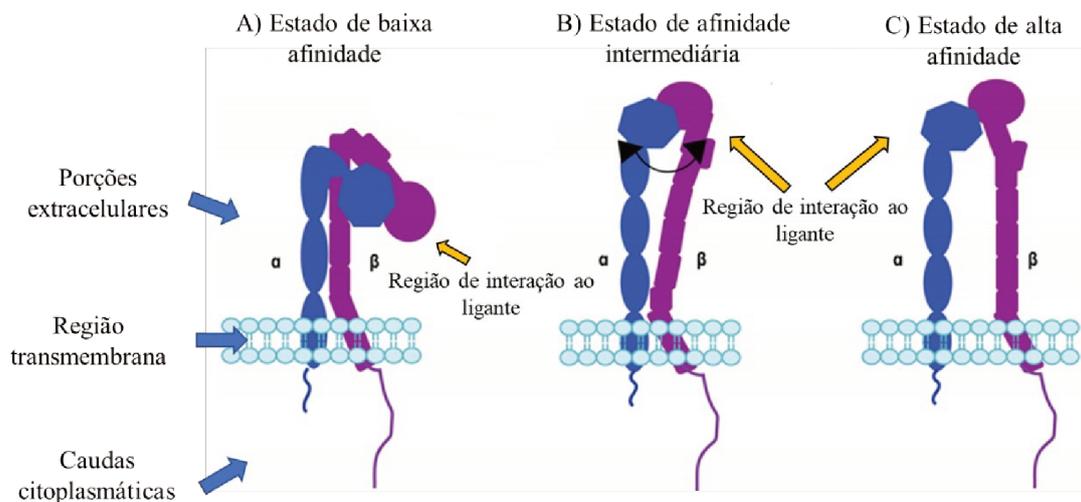


**Figura 3 - Representação esquemática dos 24 heterodímeros constituintes da família das integrinas de vertebrados.**

Fonte: Imagem modificada de BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. Cell and Tissue Research, vol. 339, pp. 269-280, 2010.

A comunicação por meio destes receptores é bidirecional, o que se traduz em uma sinalização de “dentro para fora” (*inside-out*), como durante a transdução de sinais provenientes do meio intracelular, que alteram a conformação destas glicoproteínas, levando-as a um estado ativado. Ou ainda, em uma sinalização de “fora para dentro” (*outside-in*), desencadeada pela interação das integrinas com seus ligantes no espaço extracelular, provocando alterações em sua porção citoplasmática que levam à ativação de diferentes vias de sinalização responsáveis pela regulação de comportamentos

celulares, tais como a migração, a sobrevivência, a diferenciação, a adesão ao substrato e a proliferação (KADRY & CALDERWOOD, 2020).



**Figura 4 – Representação gráfica das alterações conformacionais em uma integrina, induzidas por sinais do meio intracelular (sinalização inside-out).**

Após a interação de um ligante junto de sua porção citoplasmática, as integrinas, formadas pela combinação de duas subunidades distintas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), passam por mudanças conformacionais que incluem, o alongamento de sua estrutura, com conseqüente distanciamento da região de interação aos ligantes extracelulares da membrana plasmática da célula e a abertura de seu sítio de ligação. As caudas citoplasmáticas também se movem, permitindo sua interação com outras proteínas citoplasmáticas. Fonte: modificado de KADRY, Y.; CALDERWOOD, D. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1862:183206, 2020.

Um destes receptores, a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , liga-se principalmente aos colágenos fibrilares (tipo I, II, III, V e XI) e a estrutura em rede do colágeno tipo IV, podendo ainda, interagir também com outros constituintes da matriz, embora com menor afinidade (MADAMANCHI, SANTORO & ZUTTER, 2014). Esta integrina é expressa por uma ampla variedade de tipos celulares, tais como plaquetas, fibroblastos, células epiteliais e, dependendo do estado de diferenciação e ativação, leucócitos e células endoteliais, evidenciando sua possível participação em uma série de respostas do organismo (ZELTZ & GUILBERT, 2016; ZWEERS *et al.*, 2007).

A ativação destes receptores está, por exemplo, relacionada com o desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa, participando desde o recrutamento inicial de leucócitos até a resolução da resposta inflamatória (KOURTZELIS *et al.*, 2017). Na literatura, alguns trabalhos correlacionam a sinalização mediada pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , com processos como a migração leucocitária através da MEC e a indução da síntese de mediadores importantes ao desenvolvimento da inflamação (WERR *et al.*, 2000;

SASAKI *et al.*, 2003; BRIAN *et al.*, 2004). De fato, a utilização de modelos animais *knockout* para integrina  $\alpha_2\beta_1$ , ou ainda, de anticorpos monoclonais ou inibidores deste receptor, elucidaram sua participação em processos inflamatórios, tais como a artrite reumatoide e a encefalomielite (TSUNODA *et al.*, 2007; PETERS *et al.*, 2012; NISSINEN *et al.*, 2015)

Durante o processo de angiogênese, incitada pelo VEGF, foi demonstrada uma alta expressão das integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$  na superfície das células endoteliais, um indicativo da importância destes receptores durante este evento. Dando suporte a este pensamento, o tratamento com anticorpos monoclonais anti- $\alpha_1$  ou anti- $\alpha_2$ , realizado *in vitro*, foi capaz de inibir a migração de células endoteliais imobilizadas em um substrato rico em colágeno do tipo I (SENGER *et al.*, 2002). San Antonio e cols. (2009) trabalhando com modelos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a ação supressora de uma molécula inibidora da integrina  $\alpha_2\beta_1$  (SMI496) sobre o processo de angiogênese, inibindo a adesão de células endoteliais ao colágeno, a migração sobre este constituinte da matriz e a angiogênese induzida pelo mesmo. Ghatak e cols. (2016) trabalhando com três modelos distintos para a análise da angiogênese *in vivo*, a saber, implantes subcutâneos de esponja, feridas excisionais, e angiogênese tumoral, demonstraram ainda uma redução do número de vasos sanguíneos recém-formados em camundongos *knockout* para as integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ .

Como mencionado anteriormente, a integrina  $\alpha_2\beta_1$  também é expressa em queratinócitos, principalmente aqueles localizados no estrato basal da epiderme, e em fibroblastos. Estudos *in vitro*, elucidaram o papel da integrina  $\alpha_2\beta_1$ , sobre a perda da adesão, a migração e a proliferação epitelial, eventos importantes durante a re-epitelização de feridas cutâneas (DUMIN *et al.*, 2001; DECLINE, & ROUSSELE, 2001). Além disso, a ativação da integrina  $\alpha_2\beta_1$  por seus substratos, mostrou-se capaz de induzir a síntese de colágeno por fibroblastos, participando também da mecanotransdução de sinais (ECKES *et al.*, 2006).

Desse modo, as integrinas se tornaram um importante alvo terapêutico levando a pesquisa científica a buscar ferramentas para a compreensão da sinalização mediada por estes receptores, e a descoberta de novas moléculas com ação farmacológica na modulação de diferentes integrinas (GOODMAN & PICARD, 2012). Nesse contexto, a pesquisa com as proteínas disintegrinas e tipo-disintegrinas presentes na peçonha das

serpentes tem inspirado diversos estudos quanto a ação destas proteínas em uma série de processos.

### 1.3 – A peçonha das serpentes e a jararagina-C

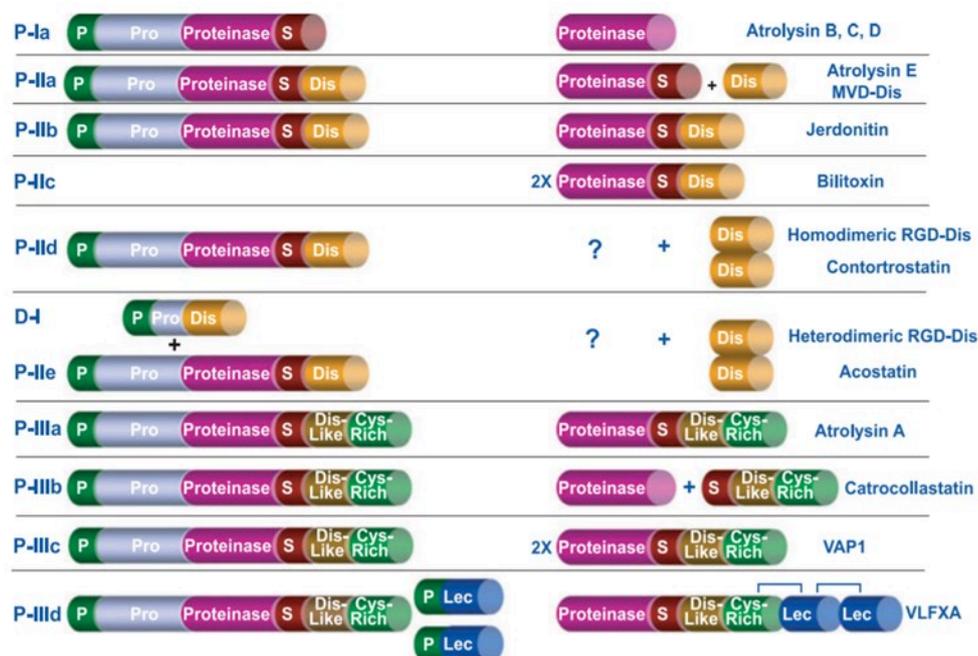
Em países tropicais, acidentes com animais peçonhentos, como escorpiões, aranhas e serpentes, são responsáveis por uma taxa significativa de mortalidade e morbidade dentro da população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). No Brasil, apenas no ano de 2019, foram registradas 265.701 notificações envolvendo acidentes com tais animais, junto ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) pertencente à Secretaria de Vigilância em Saúde. Destes, 30.482 casos correspondiam a acidentes ofídicos.

Em 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu o envenenamento por serpentes dentro do grupo de doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que, mundialmente, ocorram entre 1.8 – 2.7 milhões de casos de envenenamento, com 81.000 – 138.000 mortes a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Em todo o território brasileiro, a maioria dos casos de envenenamento por serpentes está associada ao gênero *Bothrops* (BOCHNER, FISZON & MACHADO, 2014). *Bothrops jararaca* é uma das espécies que compreendem este grupo. Com grande importância médica, dentre os efeitos mais comuns associados à peçonha destes animais destacam-se, distúrbios na hemostasia, coagulopatias, hemorragia local e/ou sistêmica, lesão e necrose tecidual (KAMIGUTI et. al, 1991). Essa diversidade de efeitos, por sua vez, contribui para a captura de suas presas, subjuguando-as ou mesmo levando-as a morte (ZELANIS et, al. 2010).

A peçonha de *B. jararaca* é uma mistura complexa de toxinas, não somente responsáveis pelas manifestações clínicas, associadas aos acidentes com estes animais, mas também de grande interesse na pesquisa biomédica e farmacológica. Componentes orgânicos, minerais e proteínas, tais como lectinas tipo C, serinoproteases, peptídeos precursores da bradiginina, L-aminoácido oxidases, fator de crescimento do endotélio vascular da peçonha de serpentes (svVEGF), disintegrinas, fosfolipases A<sub>2</sub> e as metaloproteinases da peçonha de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) compreendem este acervo de substâncias (CIDADE, 2006).

A ação altamente hemorrágica da peçonha de serpentes viperídeas está associada a certas famílias de proteínas, que podem ou não apresentar atividade proteolítica. Dentre estas moléculas destacam-se as SVMPs, inicialmente descritas como hemorraginas, termo anteriormente utilizado para designar as toxinas proteolíticas, de ação hemorrágica, presentes na peçonha (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). Ao longo dos anos, muitas SVMPs foram isoladas e tiveram a sua estrutura elucidada, possibilitando o agrupamento destas proteínas em classes, segundo a presença de determinados domínios estruturais após o seu processamento pós-traducional. As SVMPs da classe PI apresentam apenas o domínio metaloproteinase em sua estrutura. A classe PII contém um domínio disintegrina adicional em sua extremidade C-terminal. Por fim, as SVMPs da classe PIII apresentam o domínio catalítico metaloproteinase N-terminal, acrescido de um domínio tipo-disintegrina e um domínio rico em cisteínas. Algumas metaloproteinases da classe PIII, podem ainda conter domínios tipo-lectina associados ao domínio rico em cisteínas. Estas SVMPs anteriormente formavam uma classe a parte (PIV), e foram posteriormente realocadas como membros da classe P-III, devida a falta de transcritos de mRNA para estas proteínas, que possivelmente devem resultar de uma modificação pós-traducional das SVMPs da classe P-III (FOX & SERRANO, 2005; FOX & SERRANO, 2008).

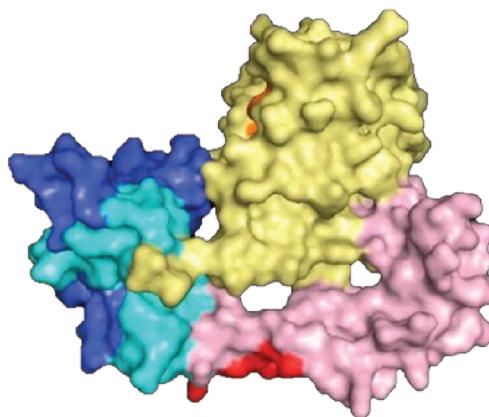


**Figura 5 - Representação esquemática do modelo proposto para a classificação das SVMPs, segundo a presença de determinados domínios em sua estrutura**

As SVMPs são sintetizadas na peçonha das serpentes como precursores latentes, passando por modificações pós-traducionais, que incluem, por exemplo, a remoção proteolítica de um ou mais de seus múltiplos domínios. P: pré-domínio. Pro: pró-domínio. Proteinase: domínio metaloproteinase. Dis: domínio disintegrina. Dis-like: domínio tipo-disintegrina. Cys-rich: domínio rico em cisteínas. Lec: domínio ligante

de lectina. S: região espaçadora. Fonte: imagem original de FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS Journal, v. 275, pp. 3016 – 3030, 2008.

A primeira SVMP da peçonha de *B. jararaca* isolada e caracterizada quanto a sua sequência de aminoácidos, recebeu o nome de jararagina (em inglês *jararhagin* = Jarar – referente a sua espécie de origem; hagin – indicando sua atividade hemorrágica). Constituída de 421 aminoácidos, a clonagem e a expressão desta proteína possibilitaram a identificação de algumas de suas características, como sua massa molecular (47 kDa) e a presença de três diferentes domínios em sua estrutura. Um domínio catalítico metaloproteinase, dependente de zinco, um domínio tipo-disintegrina, com um motivo de ligação ECD (Arg-Gly-Asp), e um domínio rico em cisteínas, estes últimos necessários à interação da proteína junto ao colágeno fibrilar e a integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Figura 6). Vale ressaltar que a jararagina purificada a partir da peçonha de *B. jararaca* apresenta uma massa molecular de 52 kDa, diferença atribuída a possíveis glicosilações dentro do domínio metaloproteinase, que podem ocorrer durante a síntese da toxina (PAINE et. al, 1992). Devido a presença dos três domínios citados acima, a jararagina é agrupada junto às SVMPs da classe PIII (FOX & SERRANO, 2008).



**Figura 6 – Estrutura tridimensional da SVMP Jararagina.**

Nesta imagem são observados diferentes domínios e subdomínios, que compõem a estrutura desta toxina. O domínio metaloproteinase é visto em amarelo, o domínio *tipo-disintegrinas*, em rosa, e em azul claro o domínio rico em cisteínas. Além destes, ainda podemos evidenciar em laranja o sítio de ligação ao zinco, em vermelho o epítipo de ligação ao colágeno e em azul escuro o fragmento JC76, responsável pela interação desta molécula com a integrina  $\alpha_2\beta_1$ . (Figura extraída de TANJONI *et al.* Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to  $\alpha_2\beta_1$  integrin and collagen. Toxicon, pp. 1098, 2010).

A jararagina é uma das SVMPs mais estudadas quanto aos seus impactos fisiopatológicos, apresentando efeitos tanto sobre as manifestações locais, quanto sistêmicas, decorrentes do envenenamento. Sua alta concentração na peçonha bruta e a facilidade em seu processo de purificação, possibilitaram o seu uso extensivo na pesquisa básica, permitindo a elucidação de inúmeros mecanismos biológicos, bem como das características estruturais associadas as SVMPs e à subfamília M12 de metaloproteinases (MOURA-DA-SILVA & BALDO, 2012). Em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, a administração da jararagina mostrou-se capaz de alterar a expressão gênica, a síntese de mediadores, a morfologia, bem como, outros aspectos do comportamento celular, tais como a migração, a proliferação, a sobrevivência e a adesão celular ao seu substrato (LOPES *et al.*, 2012; SCHATTNER *et al.*, 2005; ZIGRINO *et al.*, 2002)

Em 1994, foi identificada na peçonha de *B. jararaca* uma outra proteína com estrutura similar a jararagina, constituída por uma sequência derivada da extremidade C-terminal desta SVMP, resultante de um processo de autólise desta toxina. Esta nova proteína consistia em apenas dois domínios, um domínio tipo-disintegrina, em sua extremidade N-terminal, e um domínio rico em cisteínas em sua extremidade C-terminal. A jararagina-C (jar-C), como ficou conhecida, apesar de não possuir atividade proteolítica, devido à perda de seu domínio metaloproteinase, era capaz de se ligar a integrina  $\alpha 2\beta 1$  e desta maneira inibir a agregação plaquetária mediada pelo colágeno, assim como a jararagina (USAMI *et al.*, 1994).

A jararagina-C foi agrupada junto as proteínas disintegrinas e tipo-disintegrinas, presentes na peçonha das serpentes, grupo de polipeptídeos de baixa massa molecular, ricos em resíduos de cisteína e capazes de inibir a agregação plaquetária de forma rápida e eficiente. As disintegrinas da peçonha das serpentes podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua estrutura e função. Estruturalmente, 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 disintegrinas curtas (8 cisteínas), médias (12 cisteínas) e longas (14 cisteínas). Já as disintegrinas diméricas possuem 10 resíduos de cisteína em cada subunidade. Funcionalmente são classificadas segundo o padrão tripeptídico presente no motivo de ligação às integrinas-alvo (MARCINKIEWISK, 2013).

Apesar da ausência do domínio metaloproteinase em sua estrutura proteica, a jararagina-C também é capaz de incitar muitos dos efeitos observados após a

administração da jararagina. Em modelo *in vivo*, Clissa e cols. (2006) analisaram a importância dos diferentes domínios destas moléculas sobre o recrutamento de leucócitos no músculo cremaster de camundongos. A injeção local da jararagina-C, assim como da jararagina, foi capaz de aumentar o número de leucócitos em rolamento sobre a parede das vênulas pós-capilares deste tecido. Ainda nesse trabalho, a administração da Jar-c levou a um aumento da síntese de citocinas envolvidas na resposta inflamatória (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), após sua administração nas patas destes roedores, evidenciando o papel dos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas sobre a inflamação local observada após um acidente ofídico.

Também na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, Zychar e cols. (2019) demonstraram um aumento no número de leucócitos, após a administração de 3 diferentes toxinas, a BnP1, uma SVMP da classe P-1, a jararagina e a jararagina-C, mostrando, mais uma vez, que a presença do domínio metaloproteinase na estrutura proteica não é um fator preditivo para o recrutamento de leucócitos induzido por estas moléculas, uma vez que os mesmos efeitos foram observados durante o tratamento com a Jar-C.

Além disso, em um trabalho realizado em nosso laboratório, utilizando o modelo de inflamação crônica induzida por implantes de esponja de poliéster-poliuretano, observamos que os tratamentos com a jararagina, a jararagina-C e a jar-Phe (jararagina previamente tratada com o agente quelante 1-10 fenantrolina, perdendo sua atividade catalítica) foram capazes de modular os componentes da resposta inflamatória e dos processos de angiogênese e fibrogênese avaliados, mostrando a participação dos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas nos efeitos biológicos provocados pelas SVMPs (FERREIRA *et al.*, 2019).

Em nosso laboratório, avaliamos ainda os efeitos de outras disintegrinas, tais como a disintegrina recombinante DisBa-01 e a proteína tipo-disintegrina Alternagina-C (Alt-C), avaliadas quanto aos seus efeitos sobre formação do tecido fibrovascular induzido pelas matrizes de esponja. A DisBa-01 liga-se preferencialmente à integrina  $\alpha_v\beta_3$ , enquanto a Alt-C, assim como a Jar-C, tem maior afinidade pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ . Ambas as toxinas foram capazes de atenuar os parâmetros inflamatórios e angiogênicos avaliados, apresentando, no entanto, efeitos distintos quanto a deposição de colágeno (CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2014; RABELO *et al.*, 2019).

Além de apresentarem uma maior afinidade pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , a jararagina-C e a alternagina-C compartilham de 92% de similaridade em sua sequência de aminoácidos. Trabalhos tanto *in vitro* quanto *in vivo* têm demonstrado os efeitos da Alt-C sobre a modulação de diferentes comportamentos celulares, incluindo a migração, a adesão, a proliferação e a síntese de mediadores solúveis envolvidos em diferentes processos (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003; COMINETTI, 2004; RAMOS *et al.*, 2007). Em um modelo de cicatrização de feridas excisionais *in vivo*, o tratamento com a Alternagina-C foi capaz de acelerar o processo de reparo, incitando a formação de novos vasos sanguíneos, a secreção de citocinas pró-angiogênicas (ex.: fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF; fator de crescimento fibroblástico 1, FGF1), a proliferação de fibroblastos e a deposição dos componentes de uma nova matriz extracelular (SANT'ANA *et al.*, 2008; SANT'ANA *et al.*, 2011).

Dessa maneira, avaliamos neste trabalho os efeitos da jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina em um modelo de cicatrização *in vivo*, pois acreditamos que ela possa funcionar como um possível agente terapêutico, por meio da modulação de importantes fases e eventos envolvidos no processo de reparo, como a angiogênese, a inflamação e a deposição de colágeno, uma vez que a integrina  $\alpha_2\beta_1$  está presente em várias células envolvidas nesses processos. Esse estudo é importante não apenas como uma possibilidade terapêutica para o reparo, como também para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de inflamação, angiogênese e reparo tecidual, que possam ser influenciados pela sinalização mediada pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ .

## 2 – Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi avaliar os efeitos da jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina da peçonha de *Bothrops jararaca*, em um modelo pré-clínico de cicatrização de feridas cutâneas excisionais. A partir disso, tivemos como metas, estabelecer se essa molécula é capaz de:

- (1) modular o componente inflamatório,
- (2) modular o componente angiogênico e
- (3) modular o componente fibrótico durante o reparo tecidual em feridas cutâneas excisionais em camundongos.

*Os objetivos específicos foram:*

- (1) Avaliar os efeitos da jararagina-C sobre a velocidade de fechamento de feridas cutâneas excisionais;
- (2) Avaliar, por meio de parâmetros (imuno)bioquímicos, histológicos e de biologia molecular, os efeitos da jararagina-C sobre a inflamação, a angiogênese e a deposição de colágeno, bem como a produção de citocinas importantes para esses processos durante a cicatrização de feridas cutâneas excisionais.

### 3. MATERIAL 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).

#### 3.2 – Animais

O protocolo experimental envolvendo animais foi realizado de acordo com as normas éticas de pesquisa animal, sendo este trabalho aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU), parecer 085/16 (Anexo 1). Foram utilizados 160 camundongos machos, da linhagem Swiss, com idade entre 8 e 9 semanas, pesando entre 30 – 35g, fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Depositário de Animais do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas. Durante todo o experimento foram acondicionados em gabinetes com controle de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso a água e ração (*ad libitum*).

#### 3.3 – Modelo de cicatrização de feridas excisionais.

Para o estudo dos efeitos do tratamento intradérmico com a toxina durante a cicatrização, foram realizadas quatro feridas equidistantes no dorso dos camundongos, com o auxílio de um punch circular de biópsia cirúrgica de 5 mm. Para isso, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), aplicada via intraperitoneal, e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% (v/v). As feridas foram criadas através do pressionamento da pele com o auxílio do punch (Figura 7). A mensuração da área das feridas, para o acompanhamento da cinética de cicatrização, foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, iniciando imediatamente após a indução das mesmas (dia 0, área inicial da ferida) e ocorrendo em intervalos pré-determinados (1, 3, 7, 10 e 14 dias) (CANESSO *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2015). O cálculo da área da ferida foi realizado segundo a seguinte equação:

$$A = \left[ \left( \frac{\text{diâmetro maior}}{2} \right) \times \left( \frac{\text{diâmetro menor}}{2} \right) \times \pi \right]$$

Onde: A = área mensurada

$$\pi = 3,14$$

Por sua vez, a cinética de cicatrização foi avaliada segundo a porcentagem de fechamento da ferida relativo ao tamanho original da mesma, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de fechamento} = \left[ 1 - \left( \frac{A_f}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde:  $A_f$  = Área da ferida mensurada em um intervalo de tempo.

$A_0$  = Área inicial da ferida, mensurada após a sua indução.

Nos intervalos de tempo de 1, 3, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com tiopental (Thiopentax ®, Cristália). Para as análises histológicas, bioquímicas e moleculares, a região da ferida junto da pele em seu entorno foram coletadas com o auxílio de um punch de biópsia circular de 8mm.



**Figura 7 – Modelo de feridas excisionais em camundongos.**

Fonte: MOREIRA, C.; CASSINI-VIEIRA, P.; DA SILVA, M.; BARCELOS, L. da. Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. BIO-PROTOCOL, v. 5, n. 22, 2015.

### 3.4 – Grupos experimentais e tratamento das feridas

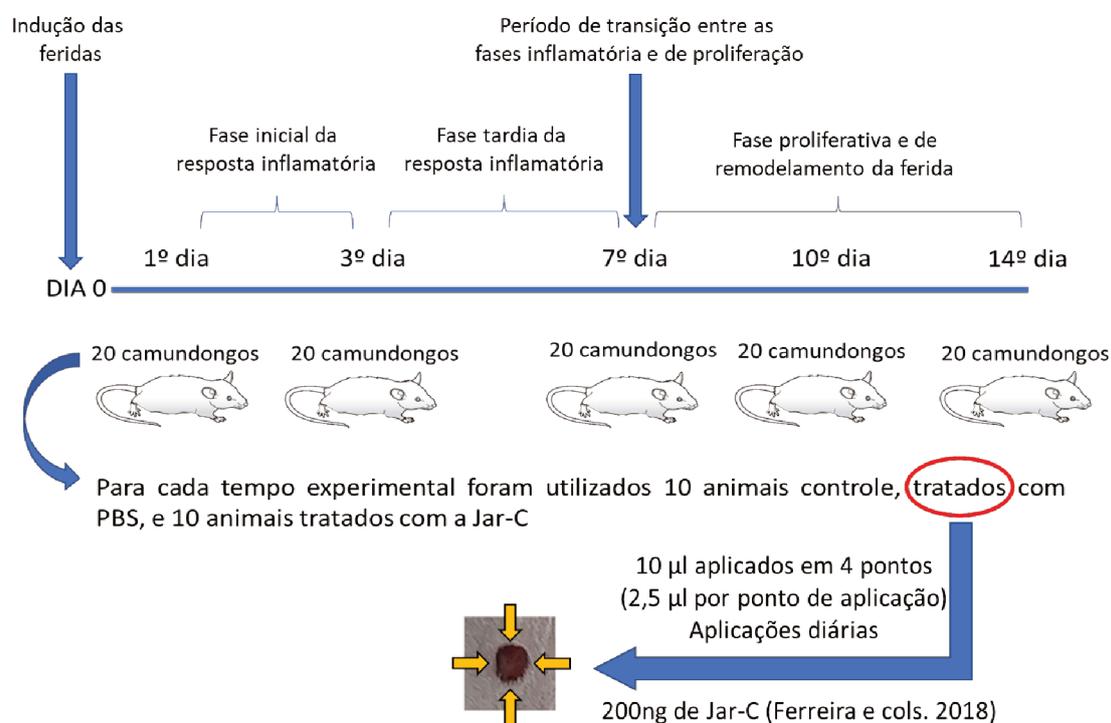
Os camundongos foram divididos aleatoriamente (n = 8-10) entre os seguintes grupos experimentais:

8-10 animais tratados com PBS (grupo controle) e eutanasiados 1 dia após a lesão.
8-10 animais tratados com a Jar-C e eutanasiados 1 dia após a lesão.
8-10 animais tratados com PBS (grupo controle) e eutanasiados 3 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com a Jar-C e eutanasiados 3 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com PBS (grupo controle) e eutanasiados 7 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com a Jar-C e eutanasiados 7 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com PBS (grupo controle) e eutanasiados 10 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com a Jar-C e eutanasiados 10 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com PBS (grupo controle) e eutanasiados 14 dias após a lesão.
8-10 animais tratados com a Jar-C e eutanasiados 14 dias após a lesão.

Cada uma das quatro feridas realizadas no dorso dos animais recebeu 10  $\mu$ L das substâncias testadas, aplicados em 4 pontos equidistantes nas bordas das feridas (2,5  $\mu$ L por ponto), com o auxílio de uma seringa Hamilton conectada a uma agulha gengival longa. Durante o tratamento os animais foram sedados com anestésico inalatório isoflurano (Isoflorine <sup>®</sup> Cristália, Brasil), permitindo a administração intradérmica da molécula.

A administração de 200 ng da Jar-C por ferida foi determinada com base em nosso trabalho anterior (FERREIRA *et al.*, 2018), onde foram observados os efeitos desta toxina sobre o desenvolvimento de um tecido de granulação induzido por implantes de esponja de poliéster-poliuretano. Neste modelo, a formação de um tecido fibrovascular possibilita

a avaliação concomitante e *in vivo* de processos também observados durante a cicatrização (inflamação, angiogênese e a deposição de colágeno). Observamos com este estudo a capacidade da jararagina-C em modular tais eventos, como a atividade leucocitária nos implantes, a secreção de citocinas associadas com a formação de novos vasos sanguíneos e com a fibrogênese, além de uma maior deposição de colágeno nos implantes tratados com esta proteína. As feridas foram coletadas nos tempos pré-determinados acima, pois dessa maneira, conseguiríamos observar o comportamento de processos como a inflamação, a angiogênese e a deposição de colágeno, durante todas as fases do processo de cicatrização. A figura 8 abaixo esquematiza o delineamento experimental mencionado neste parágrafo.



**Figura 8 – Representação gráfica do delineamento experimental utilizado.**

Além dos grupos descritos na tabela, ainda realizamos o tratamento intradérmico com a metaloproteinase jararagina, precursora da Jar-C, e também com a jararagina após a incubação desta com o agente quelante 1-10 fenatrolina (Jar-Phe), responsável por inibir sua atividade catalítica. A administração destes compostos, entretanto, não alterou a velocidade de cicatrização das feridas excisionais, embora alguns dos eventos avaliados, tais como a inflamação, a angiogênese e, principalmente, a deposição de colágeno, tenham apresentado diferenças entre os tratamentos (APÊNDICE)

### 3.5 – Dosagem de hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina nas feridas foi dosado a partir da técnica de Drabkin como um método indireto para avaliação da neovascularização das mesmas (PLUNKET & HAILEY, 1990; HU *et al.*, 1995). As amostras, neste caso ½ ferida por animal, foram pesadas e homogeneizadas em 1mL de reagente cromogênico específico para hemoglobina (kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest, Brasil) e, em seguida, centrifugadas por 40 minutos a 12.000 x g a 4 °C. Parte do sobrenadante foi coletado e filtrado em filtros de 0,22 µm (Millipore). A quantificação do conteúdo de hemoglobina foi realizada tendo como base uma curva-padrão de concentrações conhecidas. 200 µL das amostras e dos pontos da curva foram transferidos em duplicata para placas de 96 poços. A concentração de hemoglobina foi calculada a partir da absorbância das amostras em comprimento de onda de 540 nm e os resultados expressos em µg de Hb por mg de peso úmido de tecido.

### 3.6 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma heme-peroxidase presente em grande quantidade no interior dos grânulos azurófilos de neutrófilos, liberada para dentro dos fagolisossomos ou para o espaço extracelular durante a resposta inflamatória. O conteúdo deste marcador foi avaliado nas amostras de ½ ferida de cada animal, utilizando a técnica de Bradley e cols. (1982). As amostras foram pesadas, homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 5,4) e, em seguida, 300 µL do homogenato foram transferidos para um novo microtubo (eppendorf) de 1,5 mL. A esta solução foram acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 20 segundos e submetidas a 3 ciclos de congelamento rápido em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. Após este processo, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C e 200 µL do sobrenadante utilizados para o ensaio de atividade enzimática. A reação seguiu a seguinte ordem, em um microtubo (eppendorf) de 1,5 mL foram adicionados 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, em seguida, 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck) e por fim os 200 µL do sobrenadante da amostra. O tempo da reação foi cronometrado e padronizado em 1

minuto. Após este intervalo a reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico – Merck) a 4 M. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  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).

### 3.7 - Avaliação da atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG)

A n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A quantificação desta enzima por meio da técnica de Bailey (1998) e adaptada por Barcelos e cols. (2005), foi utilizada como um marcador indireto da presença destas células junto da ferida em cicatrização. Após a eutanásia dos camundongos foram coletadas  $\frac{1}{2}$  ferida de cada animal, estas foram pesadas e então homogeneizadas em 2,0 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $960 \times g$  por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado para o ensaio de avaliação da atividade enzimática. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das amostras em duplicata, nas quais foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do substrato (p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 0,2M, pH 10,6 e a absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplaca, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG nas feridas 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- $\beta$ -D-glicosamina com a n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol/mg de peso úmido do tecido.

### 3.8 - Avaliação da produção de colágeno solúvel

A produção de colágeno nas amostras de  $\frac{1}{2}$  feridas foi quantificada colorimetricamente baseada na reação de formação do complexo colágeno-Picrosirius Red. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada por Campos e colaboradores (2006). Sucintamente, as amostras de ferida foram homogeneizadas em solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1%. Em

seguida, os debris foram removidos pela centrifugação a  $6000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .  $50\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos (Eppendorf) de  $1,5\text{ mL}$  e a estes foram adicionados  $50\mu\text{L}$  do reagente Picrossirius Red. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrosirius red foi separado por centrifugação a  $10.000 \times g$  durante 15 minutos, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em  $1\text{ mL}$  de reagente alcalino ( $\text{NaOH } 0,5\text{ M}$ ). A absorbância foi quantificada a  $540\text{ nm}$  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  $\mu\text{g}$  de colágeno por  $\text{mg}$  de peso úmido de tecido.

### 3.9 - Dosagem de citocinas e quimiocinas

Para a avaliação das citocinas  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{CXCL-1}$ ,  $\text{CCL-2/JE/MCP-1}$ ,  $\text{VEGF}$ ,  $\text{bFGF}$  e  $\text{TGF-}\beta 1$  envolvidas nos processos de inflamação, angiogênese e fibrogênese, utilizou-se o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*). Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi congelado em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior dosagem de citocinas. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com  $100\mu\text{L/poço}$  de solução de anticorpo monoclonal anti-camundongo para a citocina em análise e incubadas a  $4^\circ\text{C}$  overnight. Em seguida, fez-se a lavagem da placa quatro vezes com  $300\mu\text{L/poço}$  com Tween 20  $0,05\%$  em PBS,  $\text{pH } 7,4$ . Posteriormente, foi adicionado na placa, o tampão de bloqueio ( $5\%$  BSA em PBS,  $\text{pH } 7,4$ ), seguido de incubação por 2 horas. Após nova etapa de lavagem, foram adicionados à placa,  $100\mu\text{L/poço}$  dos padrões e das amostras, em seguida as placas foram novamente incubadas a  $4^\circ\text{C}$  overnight. Após nova lavagem das placas, foram adicionados  $100\mu\text{L/poço}$  de solução de anticorpo (biotinilado anti-camundongo) para a citocina em questão. As placas foram incubadas por 2 horas. Após lavagem, foram adicionados  $100\mu\text{L/poço}$  de solução de estreptavidina-HRP e incubadas por 20 minutos. Após nova lavagem, foi realizada a reação cromogênica com o substrato TMB (TMB - Sigma),  $100\mu\text{L/poço}$  diluído em tampão citrato (acrescido de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30\text{ v/v}$ ),  $\text{pH } 5,0$ . Em seguida, as placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de  $50\mu\text{L/poço}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1\text{ M}$  e as placas analisadas em O.D.  $540\text{ nm}$ . 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 $\beta$ -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 – RT-PCR

#### 3.10.1 – Coleta do material para análises moleculares

Após a eutanásia dos animais, as feridas e a pele ao seu entorno, foram removidas com o auxílio de um punch de biópsia de 8 mm e cortadas perpendicularmente em duas metades. A uma destas metades foram imediatamente adicionados 750  $\mu$ L do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para a extração do RNA. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer, à temperatura de -80 °C, até o momento das análises moleculares.

#### 3.10.2 – Extração do RNA

A extração do RNA ocorreu segundo as orientações do fabricante. As amostras foram descongeladas em gelo e homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio para cada 750  $\mu$ L de Trizol. Foi realizada a agitação em vórtex durante 15 segundos e após esta etapa, os microtubos foram mantidos em repouso por 2 minutos em temperatura ambiente. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa, localizada na porção superior do tubo e contendo o RNA, foi transferida para um novo microtubo, no qual foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após este intervalo, centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet remanescente foram adicionados 750  $\mu$ L de etanol 75% v/v. As amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 7500 g durante 5 minutos por 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados abertos até a secagem completa dos

pellets que, por fim, foram diluídos em 25  $\mu\text{L}$  de água DNAase e RNAase-free. Após a extração, a qualidade do RNA foi confirmada por meio de um gel de eletroforese em agarose 1,5%. Em seguida, a quantificação das amostras de RNA foi realizada por meio do aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). A quantificação foi realizada por meio da absorção em comprimento de onda de 260nm, utilizando 2 $\mu\text{l}$  da amostra pura. A concentração final foi fornecida em ng/ $\mu\text{L}$  e a pureza do RNA foi avaliada pela correlação 260/280 (RNA/proteínas).

### 3.10.3 – Síntese de cDNA

Em um microtubo foram adicionados 2,0  $\mu\text{g}$  de RNA, 0,5  $\mu\text{g}$  do primer Oligo dT e água livre de nucleases até o volume final de 15  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas por 5 minutos a 70°C para permitir a hibridização do primer e, posteriormente, mantidas no gelo. Em seguida, em cada uma das amostras, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma mistura de reagentes contendo uma concentração final de 10 mM de cada dNTP, 5X do tampão de reação da enzima, 200U da enzima transcriptase reversa (M-MLV RT, Promega) 25 unidades de RNasin e água livre de nucleases para um volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C, permitindo a transcrição reversa do mRNA. Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C.

### 3.10.4 – PCR em tempo real

Para a realização da técnica de PCR em tempo real utilizamos sondas Taqman para análise da expressão de *tnf- $\alpha$*  (Mm.PT.58.12575861), *ccl2* (Mm.PT.58.42151692), *iNOS* (Mm.PT.58.43705194), *Mrc-1* (Mm.PT.58.42560062), *Arg1* (Mm.PT.58.8651372), *Fizz-1* (Mm.PT.58.43062398), *tgm2* (Mm.PT.58.12507338) e *b2m* (Mm.PT.39a.22214835) como gene normatizador.

Para a reação de PCR, foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA em volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 5  $\mu\text{L}$  de PrimeTime Gene Expression Master Mix 2X (Integrated DNA Technologies, EUA), 0,25  $\mu\text{L}$  da sonda do gene normatizador (*b2m*), 0,25  $\mu\text{L}$  da sonda-alvo e 3,5  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases. A amplificação foi realizada em aparelho termociclador StepOne PCR System (Applied Biosystems, EUA). As condições para

amplificação foram as seguintes: 95 °C por 3 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. Para a análise, uma relação comparativa entre os ciclos de reação (Ct) foi utilizada para determinar a expressão gênica em relação ao controle b2m (constitutivo). Os resultados foram obtidos com o auxílio do software StepOne PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se a seguinte fórmula:  $\Delta\Delta Ct = \text{o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do grupo controle. Em que } \Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene constitutivo do camundongo (b2m)}$ .

### 3.11 – Análises Histológicas

Após a eutanásia, ½ ferida proveniente do dorso de cada animal foi fixada em solução metacarn (60% v/v metanol, 30% v/v clorofórmio e 10% v/v ácido acético) por um período mínimo de 4 horas em geladeira. Em seguida, as amostras foram submetidas as etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Após a confecção dos blocos histológicos, os mesmos foram submetidos à microtomia (MICROM/HM-315) para a obtenção de secções com 5µm de espessura.

A visualização geral da estrutura do tecido em cicatrização, bem como a quantificação do número de vasos sanguíneos, foi realizada a partir dos cortes histológicos corados com tricrômico de gomori. Os vasos considerados para esta contagem eram aqueles com lúmen e endotélio visíveis, com ou sem eritrócitos em seu interior. Para esta avaliação foram obtidas imagens de 15 a 20 campos aleatórios na região do tecido em cicatrização, capturadas com o auxílio de um microscópio LEICA ICC50 (objetiva de 40X e ocular de 10X).

A quantificação de mastócitos foi realizada nos cortes corados com azul de toluidina. Tais células sofrem um fenômeno conhecido como metacromasia, onde os seus grânulos coram-se em púrpura/violeta, devido à alta concentração de radicais ácidos presentes em glicosaminoglicanos como a heparina (SRIDHARAN & SHANKAR, 2012). Para a realização desta quantificação foram obtidas imagens de 15 a 20 campos, padronizados segundo o intervalo de tempo avaliado, capturadas com o auxílio de um microscópio LEICA ICC50 (objetiva de 40X e ocular de 10X).

Por fim, a quantificação e observação da organização das fibras de colágeno na foram avaliadas nos cortes histológicos corados com picrossirius red. Para isso, foram realizadas entre 5 e 10 capturas em campos aleatórios do tecido em cicatrização, padronizado segundo o intervalo de tempo. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio Nikon TS 100 com e sem o uso de um filtro de polarização (objetiva de 20X e ocular de 10X). Sob a luz polarizada é possível a diferenciação entre as fibras de colágeno do tipo I (marcadas em vermelho), as fibras de colágeno do tipo III (marcadas em verde) e as áreas de sobreposição (em amarelo/laranja) (JUNQUEIRA, BIGNOLAS & BRENTANI, 1979). As imagens foram digitalizadas com o auxílio do sistema de microcâmera Optcam e avaliadas com o software Image J (NIH, Bethesda, USA).

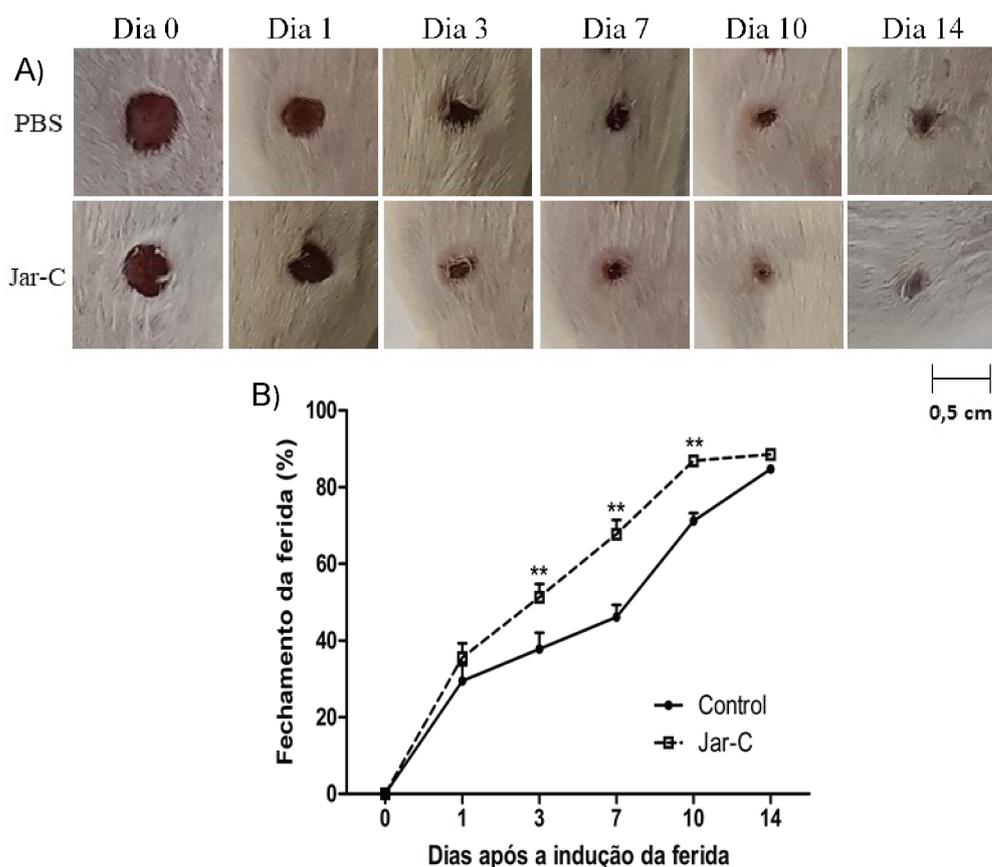
### 3.12 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste *t* de *Student*, dados não pareados, quando os dados consistiam de apenas dois grupos. A comparação entre os grupos nos experimentos de cinética foi realizada pelo teste estatístico *two-way* ANOVA, para verificar interações entre as variáveis independentes tempo e grupos, sendo utilizado o pós-teste de Bonferroni. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. A avaliação estatística e a construção dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 O tratamento com a jararagina-C acelerou o fechamento das feridas cutâneas

O fechamento das feridas cutâneas foi avaliado macroscopicamente, com o objetivo de averiguar a influência do tratamento intradérmico com a proteína tipo-disintegrina jararagina-C sobre este processo (Figura 9A). A porcentagem de fechamento das feridas foi calculada através da mensuração da área da ferida, logo após a sua indução, e no 1º, 3º, 7º, 10º e 14º dia após a lesão inicial. Nos animais tratados com a proteína jararagina-C, as feridas apresentaram um aumento da taxa de fechamento no 3º (\*\* $p < 0,01$ ), 7º (\*\* $p < 0,01$ ), e 10º (\*\* $p < 0,01$ ) dia do processo de cicatrização, quando comparadas ao grupo controle (PBS) (Figura 9B).



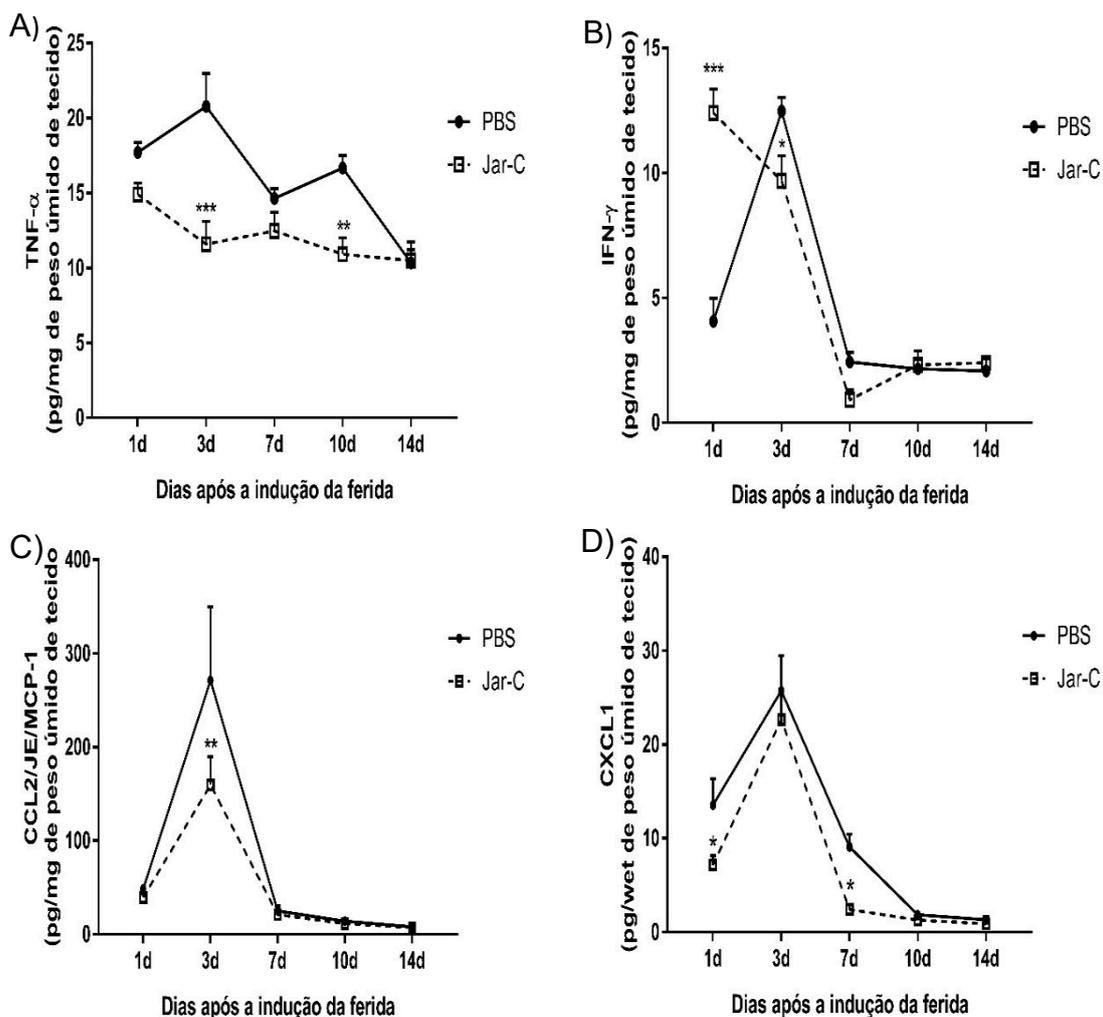
**Figura 9 - O tratamento com jararagina-C acelerou o fechamento das feridas excisionais.**

(A) Análise macroscópica do fechamento das feridas nos grupos controle (PBS) e tratado (Jar-C). (B) Representação gráfica da porcentagem de fechamento das feridas. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA)

#### 4.2 - Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios durante o processo de cicatrização.

Durante a cicatrização, as etapas constituintes deste processo são coordenadas pela liberação de citocinas, responsáveis por uma ampla variedade de efeitos biológicos. A resposta inflamatória, orquestrada por alguns destes mediadores, pode, no entanto, prolongar-se, provocando atrasos no reparo tecidual. Nos animais tratados com a jararagina-C, os níveis de TNF- $\alpha$  se mantiveram inferiores àqueles observados no grupo controle, na maior parte do intervalo de tempo avaliado, desde o 1º até o 10º dia após a lesão inicial (3º dia  $p < 0,001$ , 10º dia  $p < 0,01$ ) (Figura 10A). Já a citocina IFN- $\gamma$ , bastante correlacionada a ativação de macrófagos M1 no leito da ferida, parece ter sua síntese e liberação antecipadas, após o tratamento com a Jar-C, cujas feridas apresentaram maiores níveis deste mediador no primeiro dia após a lesão ( $p < 0,001$ ) (Figura 10B).

Os níveis de CXCL-1, quimiocina associada ao recrutamento de neutrófilos, mostraram-se menores nas feridas dos animais tratados com a toxina, no 1º e 7º dia do processo de cicatrização ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C). Além disso, no 3º dia após a lesão, durante o pico de secreção da quimiocina CCL2/JE/MCP-1, associada com o recrutamento de monócitos a partir da circulação sanguínea, o tratamento com a jararagina-C levou a redução dos níveis mensurados desta quimiocina ( $p < 0,01$ ) (Figura 10D). Nas feridas de ambos os grupos de animais, observou-se durante a cinética de produção destes mediadores, a mensuração de maiores concentrações durante o início da cicatrização, correspondente a fase inflamatória deste processo, com consequente redução dos mesmos até o 14º dia após a indução das feridas. Estes resultados sugerem que o tratamento com a jararagina-C possa atenuar a síntese de mediadores pró-inflamatórios durante processo de cicatrização.



**Figura 10 - Cinética da síntese de citocinas pró-inflamatórias nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização**

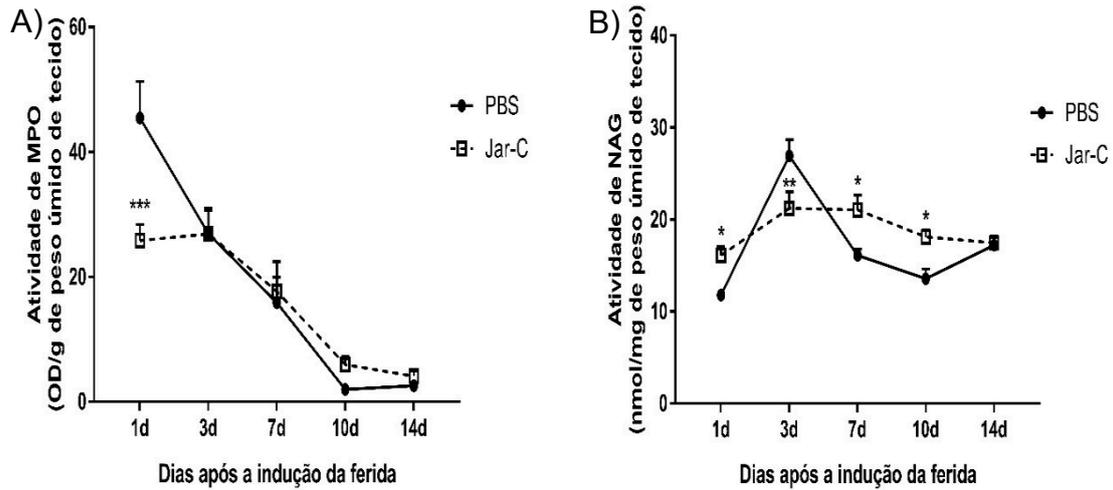
Perfil da síntese de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IFN- $\gamma$ , (C) CXCL-1 e (D) CCL2/JE/MCP-1 nas feridas de animais do grupo controle (PBS), ou tratados com a proteína tipo-disintegrina jararagina-C (Jar-C), em diferentes intervalos de tempo após a indução das lesões. Os níveis das citocinas foram avaliados por meio do ensaio de ELISA. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA)

#### 4.3 - Avaliação do perfil de leucócitos nas feridas após o tratamento com jararagina-C

O acúmulo de neutrófilos e macrófagos nas lesões, foi indiretamente mensurado por ensaios bioquímicos, baseados na atividade das enzimas MPO e NAG, sendo a MPO um marcador associado com a presença de neutrófilos, e a NAG um indicador da presença de macrófagos ativados. Durante a cinética de cicatrização, observou-se nas feridas tratadas com a jararagina-C um atraso no acúmulo de neutrófilos no leito da ferida nas primeiras 24 horas após a lesão (Figura 11A).

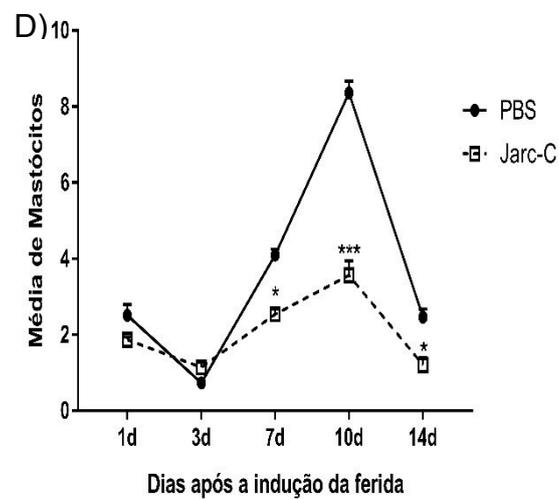
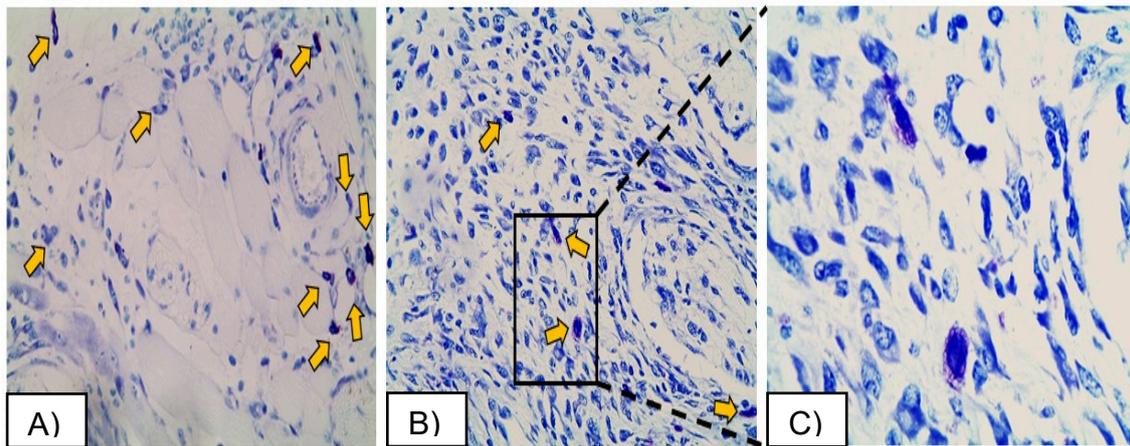
Em relação ao conteúdo de macrófagos, nos animais tratados com a Jar-C, foi observada uma maior atividade da enzima NAG, no 1º, 7º e 10º dia após a indução das feridas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas com o grupo controle. Apenas no 3º após a lesão, o grupo controle apresentou níveis mais elevados deste marcador, após atingir um pico em relação ao conteúdo destas células ( $p < 0,01$ ). No entanto, esse momento logo veio acompanhado de uma crescente redução da atividade enzimática de NAG (Figura 11B). Esses resultados sugerem que, ao contrário dos neutrófilos, o acúmulo de macrófagos no local da ferida é antecipado pelo tratamento com a jararagina-C, mantendo-se praticamente constante ao longo do período de tempo avaliado.

Por fim, para quantificarmos o número de mastócitos na região da ferida, secções histológicas do tecido em cicatrização foram coradas com azul de toluidina, possibilitando a observação da presença destas células junto ao tecido, graças ao fenômeno da metacromasia (Figura 12 A-C). O número de mastócitos, vistos no tecido de cicatrização, não apresentou diferenças entre os grupos avaliados até o 3º dia após a indução da ferida. A partir do 7º dia, observou-se um aumento no número destas células em ambos os grupos, porém de maneira mais acentuada no grupo controle, resultando em uma redução significativa do número destas células nas feridas dos animais tratados com a jararagina-C (7º dia  $p < 0,05$ ; 10º dia,  $p < 0,001$ ; 14º dia,  $p < 0,05$ ) (Figura 12D).



**Figura 11 - Cinética do infiltrado de leucócitos nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização.**

Mensuração da atividade das enzimas (A) mieloperoxidase (MPO) e (B) N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), marcadores indiretos do conteúdo de neutrófilos e macrófagos, nas feridas de animais do grupo controle (PBS), ou tratados com a proteína tipo-disintegrina jararagina-C (Jar-C), em diferentes intervalos de tempo após a indução das lesões. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA).



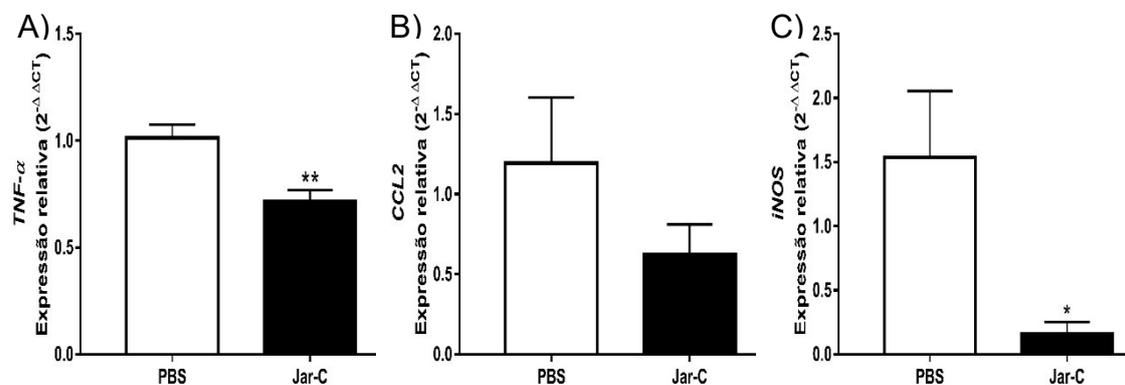
**Figura 12- Cinética da concentração de mastócitos nas feridas de camundongos tratados com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização.**

Fotomicrografias das secções histológicas de feridas do 7º dia após a lesão e coradas com azul de toluidina. Grupos (A) controle e (B) tratado. (C) Fotomicrografia em maior aumento evidenciando mastócitos metacromáticos. (D) Representação gráfica da cinética do conteúdo de mastócitos nas feridas dos animais tratados com injeções intradérmicas de PBS ou da Jar-C. As setas amarelas indicam os mastócitos observados junto ao tecido. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA).

4.4 – O tratamento com a jararagina-C resultou em uma redução da expressão de genes associados a macrófagos M1 e um aumento da expressão de genes associados a macrófagos M2.

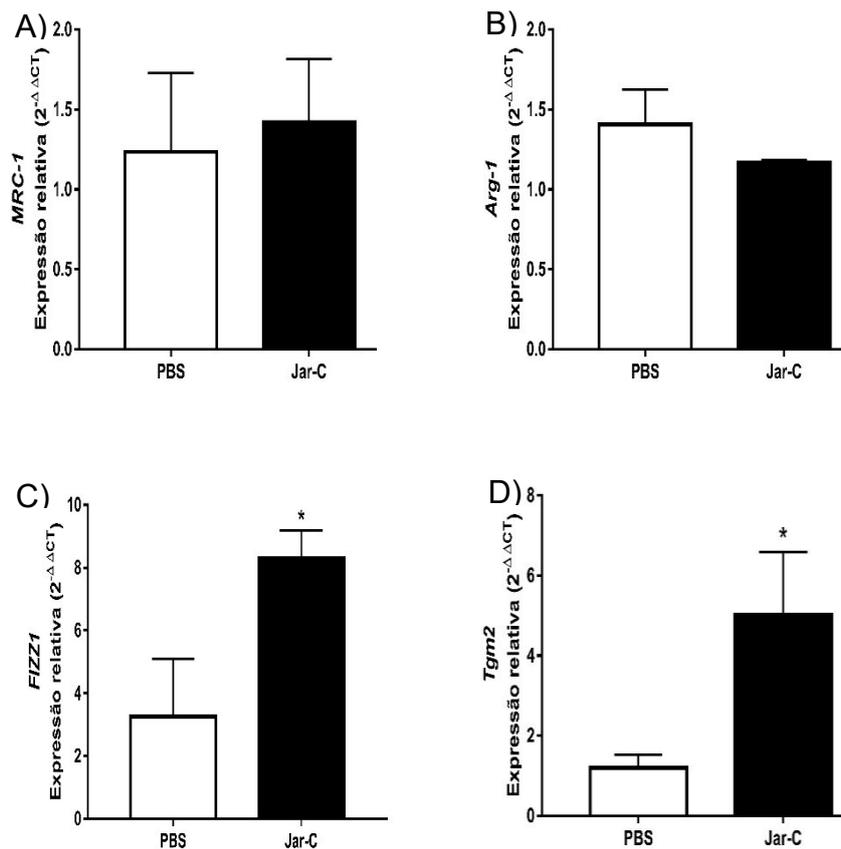
Para caracterizar fenotipicamente a subpopulação de macrófagos no 10º dia após a lesão, durante a fase proliferativa do processo de cicatrização, analisamos a expressão gênica para *Tnf- $\alpha$* , *CCL2* e *iNOS*, que caracterizam macrófagos classicamente ativados (M1), e a expressão gênica para *Mrc-1*, *Arg1*, *FIZZ1* e *Tgm-2*, que, por sua vez, caracterizam macrófagos alternativamente ativados (M2).

A análise da expressão gênica relacionada aos macrófagos M1 mostra que houve uma redução na expressão de *TNF- $\alpha$*  ( $p < 0,01$ ) e *iNOS* ( $p < 0,05$ ), bem como, uma tendência à redução na expressão de *CCL2*, nas feridas dos animais tratados com a jararagina-C em comparação ao grupo controle (Figura 14). O tratamento resultou ainda, em uma maior expressão dos genes *Fizz-1* e *Tgm2*, associados a macrófagos M2, sem alterar, no entanto, a expressão de *Mrc-1* e *Arg1*, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ )(Figura 13).



**Figura 13- A expressão relativa de genes associados ao fenótipo de macrófagos M1 é atenuada nas feridas excisionais tratadas com a jararagina-C.**

Níveis dos transcritos dos genes (A) *Tnf- $\alpha$* , (B) *CCL2* e (C) *iNOS* nas feridas coletadas no 10º dia após a lesão inicial. A RT-PCR foi normalizada utilizando o gene *b2m* como constitutivo. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4-5$  camundongos por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Teste *t* de student).

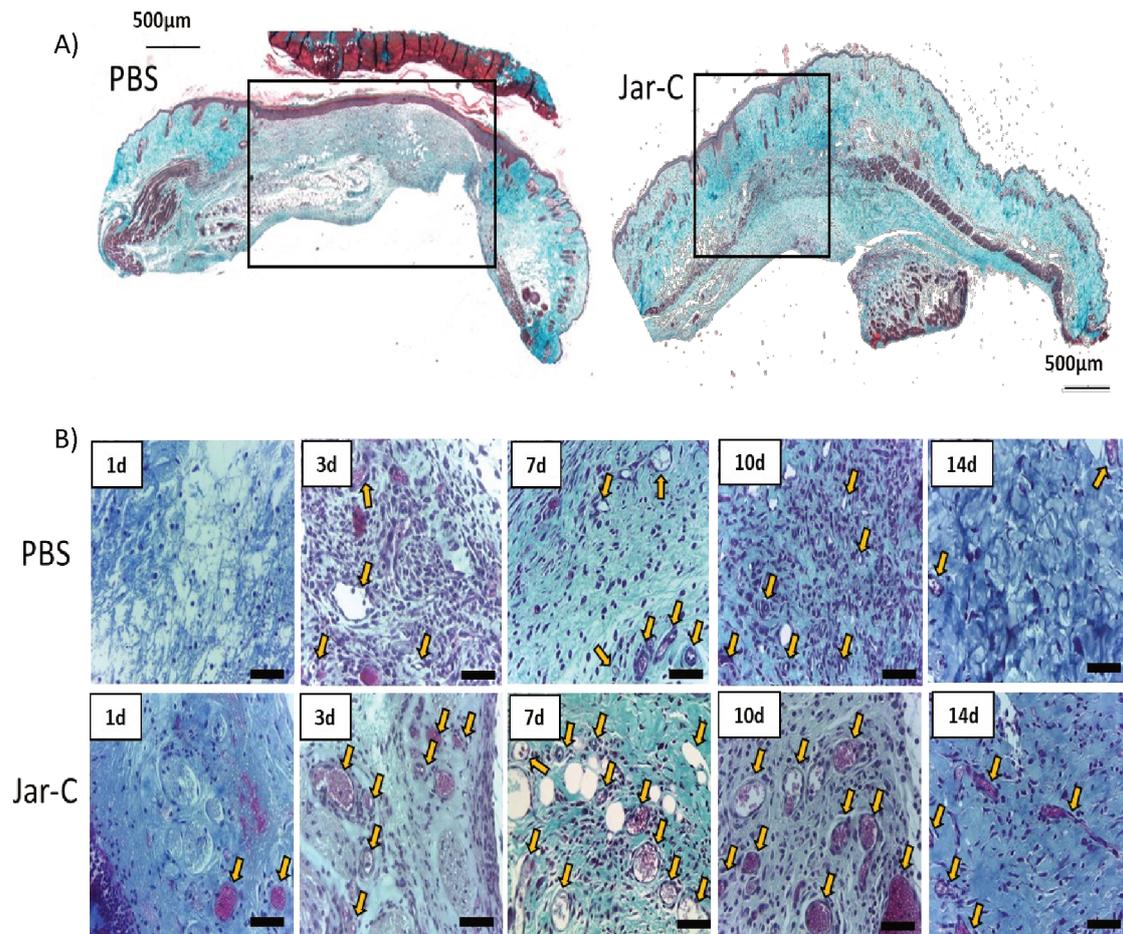


**Figura 14 - Genes associados ao fenótipo de macrófagos M2 encontram-se superexpressos nas feridas excisionais tratadas com a jararagina-C.**

Níveis dos transcritos dos genes (A) *Mrc-1*, (B) *Arg-1*, (C) *Fizz-1* e (D) *Tgm2* nas feridas coletadas no 10<sup>o</sup> dia após a lesão inicial. A RT-PCR foi normalizada utilizando o gene *b2m* como constitutivo. Os dados foram apresentados como a média ± e.p.m., n = 4-5 camundongos por grupo. \*p<0,05 (Teste t de student).

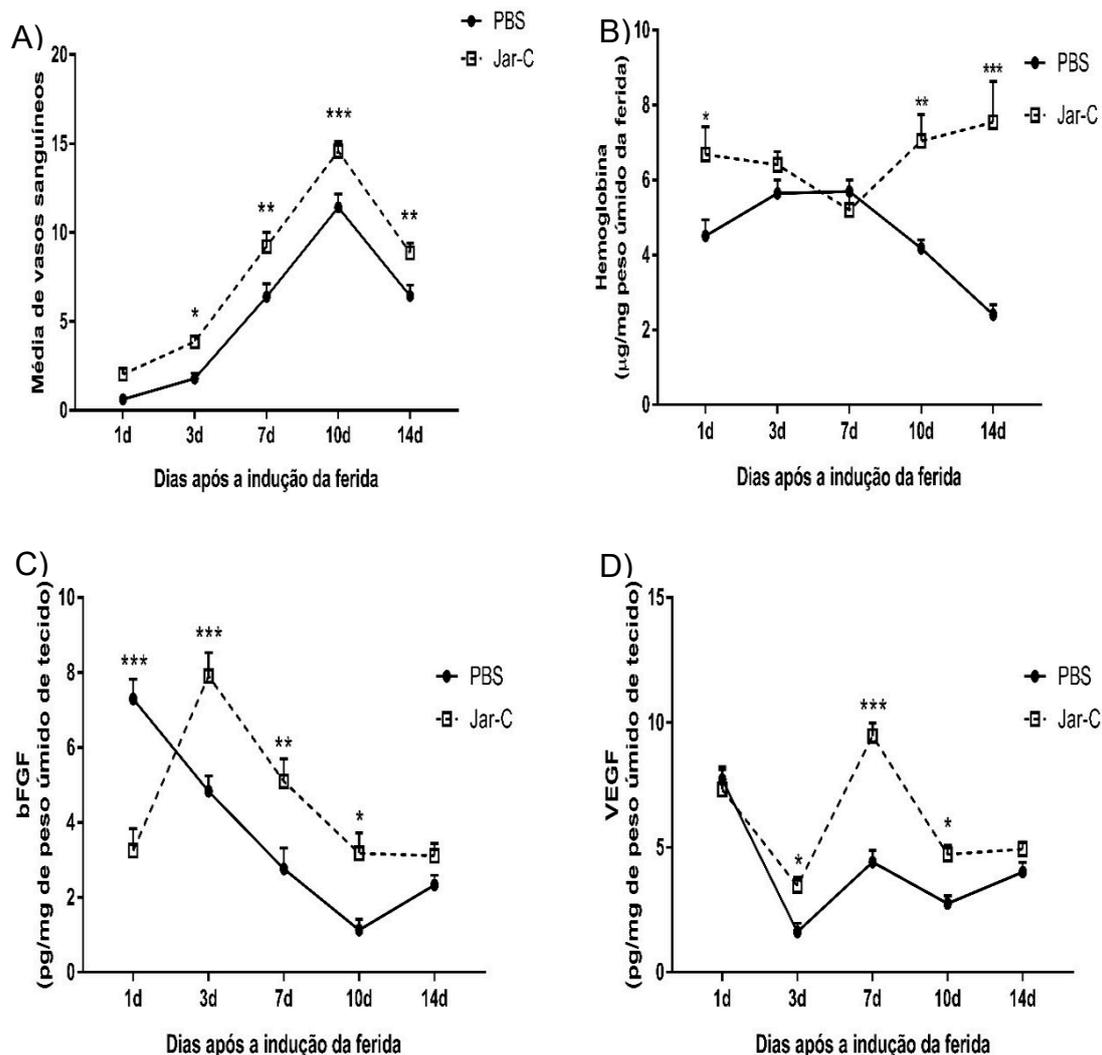
4.5 – O tratamento com a jararagina-C aumentou a angiogênese durante a cicatrização das feridas cutâneas.

O processo de angiogênese durante a cicatrização foi avaliado por meio da quantificação de vasos sanguíneos, em cortes histológico corados com tricrômico de gomori (Figura 15), pela quantificação do conteúdo de hemoglobina e pela dosagem dos níveis de citocinas pró-angiogênicas pelo método de ELISA. Nos animais tratados com a jar-C, a partir do 3º dia após a indução das feridas, a média de vasos sanguíneos observada nas secções histológicas foi maior que a média observada no grupo controle, permanecendo desta maneira até o término do experimento (3º dia,  $p < 0,05$ ; 7º dia  $p < 0,01$ ; 10º dia,  $p < 0,001$ ; 14º dia,  $p < 0,01$ ) (Figura 16A). Assim como na análise anterior, também a partir do 3º dia, os níveis das citocinas VEGF (3º dia,  $p < 0,05$ ; 7º dia  $0,001$ ; 10º dia,  $p < 0,05$ ) e FGF (1º dia,  $p < 0,001$ ; 3º dia,  $p < 0,001$ ; 7º dia,  $p < 0,01$ ; 10º dia  $p < 0,05$ ) estavam aumentados nas amostras coletadas dos animais tratados com a jararagina-C, quando comparados com o grupo controle até o 10º dia após a lesão (Figura 16C e D). Por fim, quando avaliado o conteúdo de hemoglobina, observou-se um aumento deste marcador nas feridas dos animais tratados com a jararagina-C no 1º ( $p < 0,05$ ), 10º ( $p < 0,01$ ) e 14º dia ( $p < 0,001$ ), quando comparado com o grupo controle (Figura 16B).



**Figura 15 – Fotomicrografia das secções histológicas coradas com tricrômico de gomori, utilizada para quantificação de novos vasos sanguíneos**

Fotomicrografia representativa das secções histológicas coradas com tricrômico de gomori. (A) Construção de imagens panorâmica das feridas dos grupos PBS e Jar-C, evidenciando a área em cicatrização (barra de escala 500µm). Em seguida, (B) imagens do tecido de cicatrização nos diferentes intervalos de tempo em ambos os grupos experimentais (barra de escala 50µm). Setas amarelas indicam os vasos sanguíneos observados nos tecidos.



**Figura 16 - Cinética dos parâmetros associados ao processo de angiogênese, avaliados após o tratamento com a jararagina-C, durante a cicatrização de feridas excisionais em camundongos**

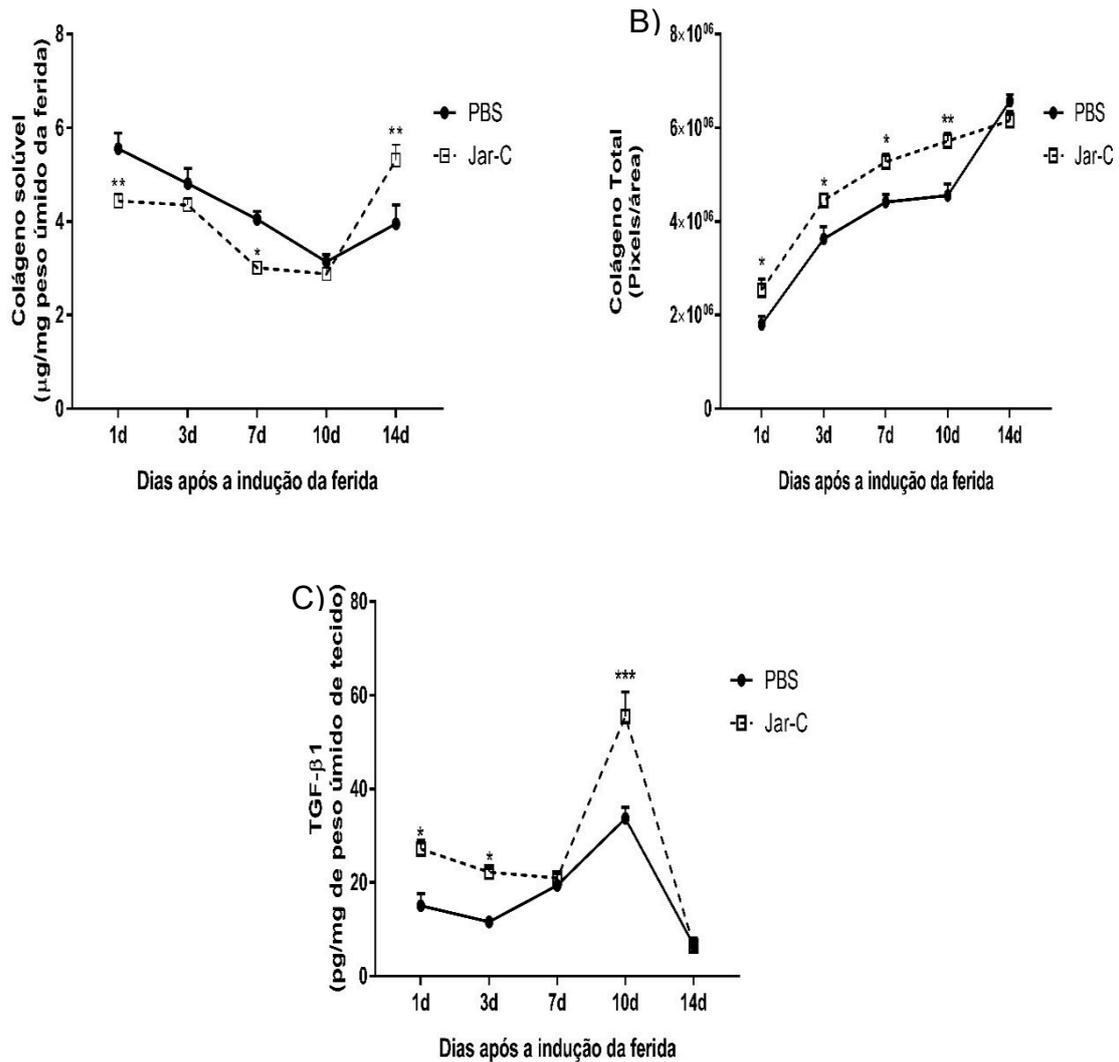
(A) Média de vasos sanguíneos observados nas secções histológicas coradas com tricrômico de gomori, durante a cinética de cicatrização nos grupos controle (PBS) e tratado (Jar-C). (B) Quantificação do conteúdo de hemoglobina nas feridas após o tratamento com PBS ou com a jararagina-C, durante o intervalo de tempo avaliado. (C) Cinética da síntese das citocinas pró-angiogênicas FGF e VEGF, avaliadas por meio de ELISA. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA).

#### 4.6 – A deposição de colágeno, especialmente de fibras de colágeno do tipo I, foi aumentada nas feridas tratadas com a Jar-C.

Especialmente durante as fases de proliferação e de maturação do processo de cicatrização, a síntese de colágeno é um evento importante para a integridade e o aumento da resistência da cicatriz. Em nosso trabalho, a produção e a deposição de colágeno foram avaliadas por meio da dosagem bioquímica do colágeno solúvel, pela avaliação das lâminas coradas com *picrosirius red* e pela quantificação dos níveis da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1.

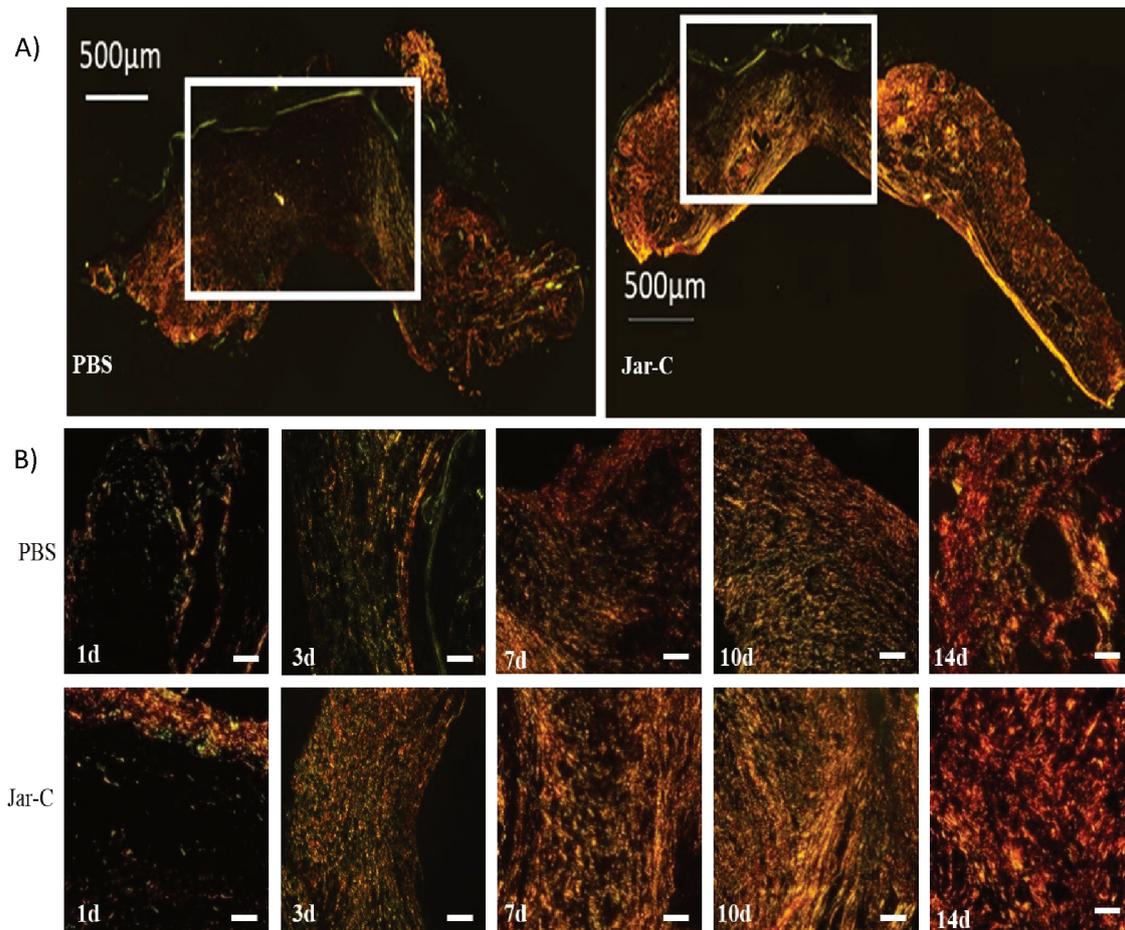
Nos grupos tratados com a toxina jararagina-C, a concentração do colágeno solúvel foi menor que a observada no grupo controle, no 1º (p<0,01) e 7º (p<0,05) dia após a lesão. No entanto, no 14º dia, os níveis deste marcador estavam aumentados nas feridas dos animais tratados com a jar-C (p<0,01) (Figura 17A). Nas lâminas coradas pelo *picrosirius red*, a quantificação da área marcada no tecido, correspondente ao colágeno total depositado, foi maior nas feridas dos animais do grupo tratado, do 1º ao 10º dia após a indução das feridas (Figura 17B). Por fim, nas feridas tratadas com a Jar-C, os níveis da citocina TGF- $\beta$ 1 foram maiores no 1º (p<0,01), 3º (p<0,01) e 10º (p<0,001) dia após a lesão, quando comparados ao grupo controle. Na cinética de ambos os tratamentos, observamos um pico da síntese desta citocina nas feridas coletadas após 10 dias da lesão (Figura 17C).

A fim de avaliarmos o tipo de colágeno predominantemente depositado, as lâminas coradas com *picrosirius red* foram também fotografadas sob um filtro de luz polarizada (Figura 18). Por meio desta técnica, conseguimos distinguir as fibras de colágeno do tipo I (visualizadas em tons de vermelho) das fibras de colágenos do tipo III (coradas em verde), bem como, visualizar as áreas de sobreposição destes constituintes (vistas em tons de amarelo ou laranja). Nas feridas tratadas com a jararagina-C, apenas no 14º dia após a lesão, observou-se um aumento significativo do conteúdo de colágeno do tipo III, em relação ao grupo controle (Figura 19A). Contudo, a deposição de colágeno do tipo I, foi sempre maior ao longo de todo o intervalo experimental, nas feridas dos animais tratados com a proteína (Figura 19B). A predominância deste tipo de fibra, foi observada também, pela razão entre ambas, indicando um maior estímulo à sua produção pelo tratamento com a jararagina-C (Figura 19C).



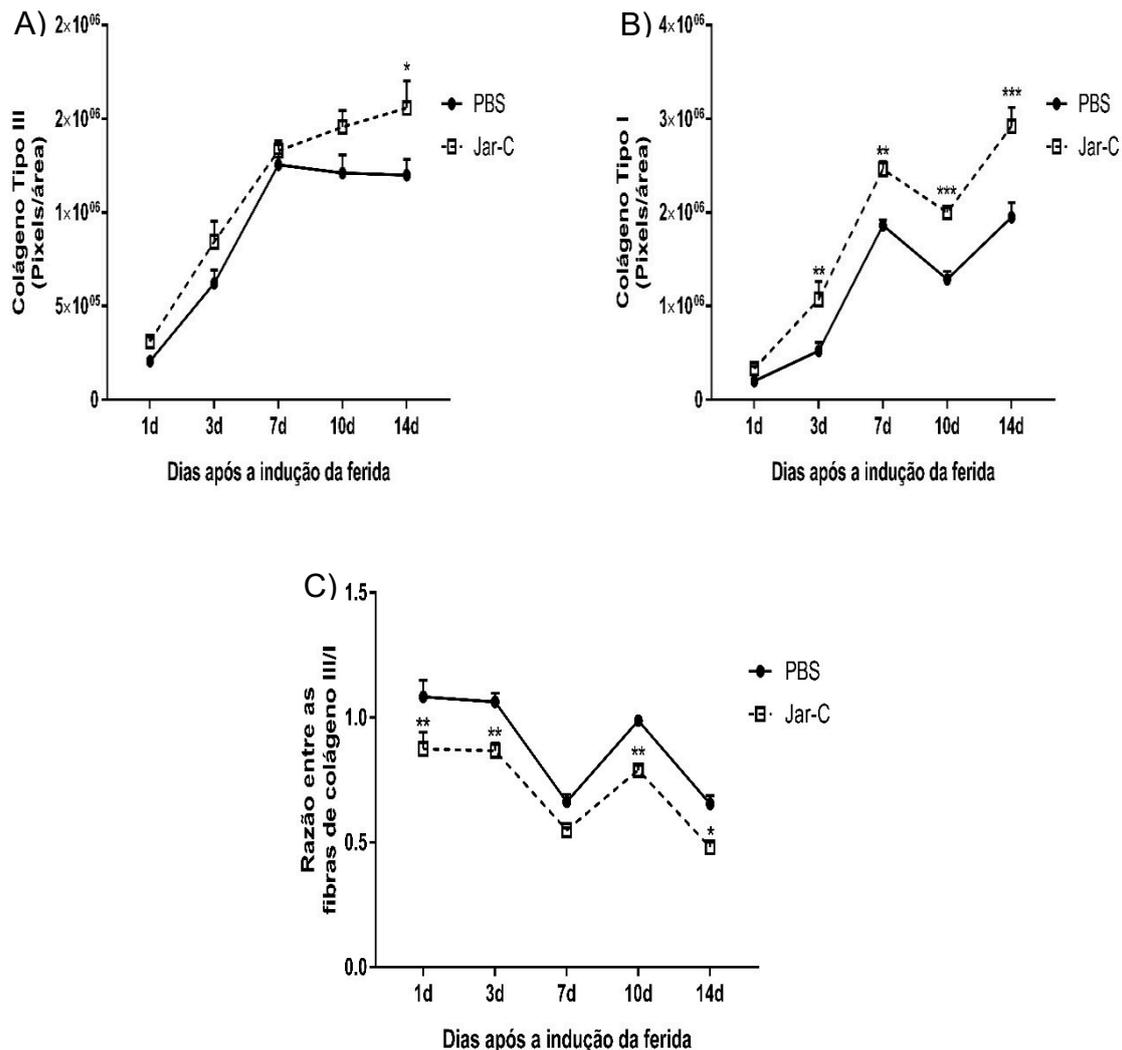
**Figura 17- Cinética dos parâmetros associados a deposição de colágeno, avaliados após o tratamento com a jararagina-C, durante o processo de cicatrização.**

(A) Mensuração da concentração de colágeno solúvel durante a cinética de cicatrização nos grupos controle (PBS) e tratado (Jar-C). (B) Quantificação da área marcada nos cortes corados com *picrosirius red*, correspondente ao colágeno depositado, durante o intervalo de tempo avaliado. (C) Cinética da síntese da citocina pró-fibrogênica TGF-β1, avaliada por meio de ELISA. Os dados foram apresentados como a média ± e.p.m., n = 8-10 camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 (2-way ANOVA).



**Figura 18 – Fotomicrografias da deposição das fibras de colágeno do tipo I e das fibras de colágeno do tipo III, após o tratamento com a jar-C, durante a cicatrização de feridas excisionais.**

Fotomicrografia representativa das secções histológicas coradas com *picrosirius red*, sob filtro de luz polarizada. (A) Construção de imagens panorâmicas das feridas dos grupos PBS e Jar-C, evidenciando a área em cicatrização (barra de escala 500µm). Em seguida, (B) imagens do tecido de cicatrização nos diferentes intervalos de tempo em ambos os grupos experimentais (barra de escala 50µm). Sob a luz polarizada, as fibras de colágeno do tipo III são marcadas em verde, já a fibras de colágeno do tipo I são marcadas em vermelho. As áreas de sobreposição entre estas fibras estão marcadas em amarelo/alaranjado.



**Figura 19 - Análise da área de cicatrização das feridas quanto ao conteúdo de fibras de colágeno do tipo I e fibras de colágeno do tipo III**

Cinética da deposição de (A) fibras de colágeno do tipo III e (B) fibras de colágeno do tipo I, avaliadas a partir das lâminas coradas com *picrosirius red* e vistas sob um filtro de luz polarizada. (C) Razão entre o conteúdo das fibras de colágeno do tipo III pelo conteúdo de colágeno tipo I (III/I), nas feridas dos animais do grupo controle (PBS) e dos animais tratados com a proteína tipo-disintegrina (Jar-C). Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (2-way ANOVA).

## 5. DISCUSSÃO

As integrinas constituem uma família de receptores transmembrana com a capacidade de responder aos componentes e as propriedades físicas da MEC. Desta maneira, integram sinais do meio externo ao citoesqueleto da célula, interferindo sobre diversos aspectos do comportamento celular. Da mesma maneira, respondem às alterações do meio interno da célula, que as tornam mais receptivas a interação junto aos seus ligantes. (KIM, TURNBULL & GUIMOND, 2011; ASKARI *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2011). Nesse contexto, as disintegrinas e proteínas tipo-disintegrinas, polipeptídios não-enzimáticos, isolados da peçonha de serpentes e com capacidade de se ligarem a estes receptores, surgem como uma estratégia para o estudo de uma diversidade de processos fisiopatológicos, em que a sinalização mediada pelas integrinas possa estar envolvida (CALVETE, 2013; MACÊDO, FOX & CASTRO, 2015).

Muitos dos mecanismos associados a cicatrização de feridas estão sob a influência e/ou regulação da sinalização mediada por estes receptores (KOIVISTO *et al.*, 2014). Assim, estudos que visam a utilização de moléculas, cujos alvos sejam as integrinas, podem auxiliar na compreensão do papel destas glicoproteínas durante o reparo tecidual, ou ainda em processos isolados, como na inflamação, na angiogênese e na fibrogênese. Além disso, podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias e/ou produtos farmacológicos.

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez os efeitos do tratamento diário e intradérmico com a proteína jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina, isolada da peçonha de *B. jararaca*, durante as diferentes fases e sobre os diferentes componentes do processo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos. As injeções diárias com a jar-C foram capazes de acelerar a taxa de fechamento das feridas, além de modular a resposta inflamatória e aumentar a angiogênese e a deposição de colágeno, especialmente de fibras do colágeno tipo I nos tecidos.

O processo de cicatrização é caracterizado por uma fase inflamatória inicial em resposta à identificação de sinais endógenos advindos do tecido lesionado (DAMPs), ou ainda, pelo reconhecimento de produtos ou estruturas microbianas (PAMPs) (MEDZHITOV, 2008). O contato inicial com estes indutores da resposta inflamatória, leva à secreção de mediadores pró-inflamatórios pelas células residentes teciduais, culminando em alterações vasculares e no efluxo de leucócitos e proteínas plasmáticas a

partir da circulação sanguínea (MEDZHITOV, 2010). Nas feridas tratadas com a jar-C, a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , CXCL-1 e CCL2/JE/MCP-1 foi atenuada pela administração intradérmica da toxina, em parte do intervalo de tempo analisado, em especial, durante a fase inflamatória do processo de cicatrização. Tais citocinas agem sobre a o recrutamento e a ativação de células inflamatórias (RIDIANDRIES, TAN & BURSILL, 2018).

Na literatura, alguns trabalhos demonstraram o papel desta proteína tipo-disintegrina sobre os eventos inflamatórios decorrentes do envenenamento. O aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios após o tratamento com a jar-C, foi documentado em outros modelos experimentais *in vivo* (CLISSA *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2018). Esta discrepância em relação aos nossos resultados pode ser atribuída a diferença entre os modelos experimentais utilizados. No trabalho de Clissa e cols. (2006), outro importante fator a ser considerado é o tempo para a análise das amostras tratadas com a jar-C, cujos níveis aumentados das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, foram mensurados após um curto intervalo da administração da toxina (2 e 4 horas) nas patas de camundongos.

Entretanto, assim como em nosso trabalho, outras disintegrinas também demonstraram a capacidade de atenuar a síntese de mediadores inflamatórios. A disintegrina recombinante Rhodostomina, por exemplo, cujo principal alvo é a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , também reduziu a síntese de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e a fagocitose por células THP-1, expostas a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Neste mesmo experimento, os autores ainda evidenciam o aumento da taxa de sobrevivência de camundongos, submetidos a um modelo de sepse polimicrobiana induzida por ligadura e punção cecal, em parte devido aos efeitos anti-inflamatórios desta disintegrina (HSU *et al.*, 2016). Durante a inflamação crônica induzida por implantes subcutâneos de esponja, o tratamento com a disintegrina recombinante DisBa-01, um ligante a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , foi capaz de atenuar a síntese destas mesmas citocinas avaliadas em nosso trabalho (CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2014). O mesmo aconteceu para a Alternagina-C, capaz de se ligar a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , após 9 dias consecutivos de injeções intra-implantes (RABELO *et al.*, 2019).

A redução destes mediadores foi acompanhada de alterações no perfil de leucócitos junto às lesões. Nas feridas dos camundongos tratados com a jararagina-C, observamos um menor acúmulo de neutrófilos, nas primeiras 24 horas após a indução das

mesmas. Concomitante ao menor conteúdo de neutrófilos, os níveis mensurados de CXCL-1, importante agente quimiotático para estas células (RIDIANDRIES, TAN & BURSILL, 2018), também foram atenuados após o tratamento com a Jar-C, no 1º e no 7º dia após a lesão. Em ambos os grupos, o conteúdo de neutrófilos se apresenta maior nas primeiras horas da cicatrização, evidenciando o acúmulo deste tipo celular durante a fase aguda da resposta inflamatória. Com o tempo estas células entram em apoptose, havendo também uma redução no recrutamento de novos neutrófilos (MANTOVANI *et al.*, 2011), o que explica a queda na atividade da enzima mieloperoxidase.

Os neutrófilos, são as primeiras células a deixarem a circulação sanguínea em direção ao local da ferida (MEDZITHOV, 2010). Embora a ativação destas células seja importante para a proteção do organismo, resultando na eliminação de patógenos e de restos teciduais, os neutrófilos também são fonte de uma série de substâncias, que em excesso, podem levar ao dano tecidual, contribuindo para o surgimento de feridas crônicas (WILGUS, ROY & MCDANIEL, 2013). De fato, enquanto o acúmulo e a atividade exacerbada destas células podem prolongar a fase inflamatória e atrasar o processo de reparo (QIAN *et al.*, 2015), a redução parcial ou a depleção completa das mesmas, já foram associadas a uma maior velocidade do fechamento de feridas em camundongos (DOVE, HE & DIPIETRO, 2003, CANESSO *et al.*, 2014). Em tecidos adultos como a mucosa oral, cuja estrutura tecidual é semelhante à da pele, a cicatrização acelerada e com formação mínima de uma cicatriz, é marcada por uma breve fase inflamatória, caracterizada por um baixo conteúdo de neutrófilos (SZPADERSKA, ZUCKERMAN & DIPIETRO, 2003; NIKOLOUDAKI, CREBER & HAMILTON, 2020).

Ainda no 1º dia após a indução das feridas, o tratamento com a jararagina-C resultou em um acúmulo precoce de macrófagos. O aumento destas células foi acompanhado por um pico na secreção da citocina IFN- $\gamma$  neste grupo. Já nos animais tratados com PBS (controles), observamos um maior acúmulo destas células e níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  e da quimiocina CCL2/JE/MCP-1, responsável pela quimiotaxia de macrófagos, apenas no 3º dia após a lesão.

A grande maioria dos macrófagos nos sítios inflamatórios é oriunda do processo de diferenciação de monócitos, recrutados a partir da circulação sanguínea. Em resposta a secreção da citocina IFN- $\gamma$ , estes macrófagos passam por um processo de ativação, associado a um perfil pró-inflamatório (M1) (SICA & MANTOVANI, 2012). Além do

seu papel sobre a ativação de macrófagos, esta citocina parece estar associada com a resolução da fase aguda da resposta inflamatória e pode contribuir com o reparo de feridas cutâneas, como demonstrado em camundongos *knockout* para IFN- $\gamma$ , onde a depleção da mesma resultou em um acúmulo de neutrófilos e um retardo no fechamento das feridas destes animais (KANNO *et al.*, 2019). Cabe ainda ressaltar que, após os primeiros dias da cicatrização, os níveis desta citocina reduzem drasticamente, tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado, um evento importante dado o efeito anti-fibrogênico desempenhado pela mesma (ISHIDA *et al.*, 2004).

O recrutamento de leucócitos, induzido pela administração da jararagina-C, também foi demonstrado *in vivo*, após a administração da mesma sobre o músculo cremaster de camundongos, resultando em um aumento no número de leucócitos aderidos a parede vascular (ZYCHAR *et al.*, 2020; CLISSA *et al.*, 2006). Ferreira e cols. (2018) também demonstraram um aumento da atividade de macrófagos em implantes subcutâneos tratados com esta toxina.

O conjunto dos dados demonstrados, parece indicar que o tratamento com a toxina possa estar acelerando a fase inflamatória do processo de cicatrização, conclusão semelhante a de Sant'Ana e colaboradores (2011) após o tratamento de feridas excisionais com a Alternagina-C. Em nosso trabalho, o tratamento com a jar-C levou a síntese aumentada de IFN- $\gamma$ , associada atividade precoce de macrófagos, logo no primeiro intervalo de tempo analisado, além de reduzir o conteúdo de neutrófilos e de outros mediadores inflamatórios mensurados, inclusive os níveis de IFN- $\gamma$ , após seu pico de secreção no 1º dia..

Contudo, nossos resultados mostram um acúmulo persistente de macrófagos junto ao tecido em cicatrização. Dessa maneira, optamos por realizar a fenotipagem destas células nas amostras coletadas no 10º dia após a lesão. As análises de PCR em tempo real demonstraram uma redução na expressão de genes associados a macrófagos classicamente ativados (M1), e um aumento na expressão de genes relacionados a macrófagos alternativamente ativados (M2).

Enquanto a persistência de macrófagos M1 está associada a cronificação da resposta inflamatória, a polarização M2 frequentemente leva a resolução da mesma, resultando na ativação de processos associados com o reparo das lesões, como a angiogênese, a proliferação e migração de fibroblastos e a síntese de novos componentes

da MEC (SICA *et al.*, 2015). A troca entre os fenótipos M1 e M2 ocorre após a estimulação por diferentes fatores, como por meio da ação das citocinas IL-4 e IL-13 e pela a fagocitose de restos de neutrófilos apoptóticos (KIM & NAIR, 2019). Além disso, em um estudo recente, Cha e cols. (2017) demonstraram *in vitro* a importância da sinalização mediada pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , durante a polarização de macrófagos M2, resultando inclusive em uma maior síntese de interleucina-10, importante mediador anti-inflamatório.

O tratamento com a Jar-C levou a redução da expressão gênica de *iNOS* e de *tnf- $\alpha$* , sendo este último dado corroborado pela redução dos níveis desta citocina, mensurados por meio da técnica de ELISA. A redução da expressão da iNOS está associada a um fenótipo pró-resolutivo de macrófagos, uma vez que altos níveis desta enzima estão relacionados com a geração de óxido nítrico durante a resposta inflamatória (LIND *et al.*, 2017). A expressão reduzida deste marcador, pode ser explicada pela alta concentração de mediadores responsáveis pela resolução da inflamação, como o TGF- $\beta$ 1, importante supressor da expressão de iNOS (SCHWENTKER *et al.*, 2002). O óxido nítrico é gerado a partir da L-arginina, que nas feridas, pode ainda ser metabolizada pela enzima arginase em ornitina, um precursor da prolina que, por sua vez, pode ser utilizada na síntese de colágeno (WITTE E BARBUL, 2002). Embora não tenhamos observado nenhuma alteração na expressão de *Arg1*, estes dados, em conjunto, podem indicar uma maior metabolização da L-arginina por uma via pró-resolutiva.

Já o gene *Tgm2*, cuja expressão foi aumentada após o tratamento com a jar-C, é responsável pela geração da enzima transglutaminase tecidual 2, envolvida em processos como a eferocitose, a angiogênese e a deposição de colágeno, principalmente associada a geração de TGF- $\beta$ 1 a partir da proteólise do TGF latente e presente no espaço extracelular (FALASCA *et al.*, 2005; ELIGINI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). A transglutaminase contribui ainda com a estabilização da matriz extracelular, por meio da formação de *cross-links* com seus componentes (VERDERIO, JOHSON & GRIFFIN, 2004). Já a expressão de Fizz, também aumentada após o tratamento com a jar-C, está geralmente relacionada a um perfil de resposta imunológica Th2, associada a sinalização mediada pelas citocinas IL-4 e IL-13, inclusive sendo atenuada pela ação de indutores clássicos do fenótipo de macrófagos M1, como IFN- $\gamma$  e lipopolissacarídeo (RAES *et al.*, 2002).

Dessa maneira, podemos teorizar que, ao menos neste modelo e nas condições testadas, a jararagina-C poderia estar contribuindo para maior ativação de macrófagos

M2, por meio da ligação à integrina  $\alpha_2\beta_1$ , ou pela indução da síntese de outros mediadores, favorecendo a resolução da inflamação e o reparo tecidual.

Por fim, o tratamento com a jararagina-C ainda foi capaz de reduzir os níveis de mastócitos íntegros no sítio da ferida, o que pode indicar uma maior ativação destas células após o tratamento com a jar-C. Alguns estudos já demonstraram a participação da integrina  $\alpha_2\beta_1$  e também da sinalização mediada pela subunidade  $\beta_1$ , presente em outras integrinas, durante os eventos de degranulação e síntese de mediadores por mastócitos. (BRIAN *et al.*, 2004; BEN-ZIMRA *ET AL.*, 2013). Além disso, Fowlkes e cols. 2013, em um ensaio *in vitro*, demonstraram o efeito da disintegrina echistatina sobre a ativação mastocitária. A taxa de degranulação dos mastócitos incubados com a toxina foi atenuada, o que, em comparação aos nossos resultados, pode elucidar papéis distintos da sinalização mediada por diferentes integrinas, já que a echistatina contém um motivo RGD em seu domínio de ligação e, desta maneira, pode diferir quanto sua integrina-alvo.

Apesar de frequentemente estarem associados a processos alérgicos, os mastócitos também estão envolvidos em uma série de respostas fisiopatológicas (LAURENTE & HERMINE, 2013; KOMI, KHOMTCHOUK & SANTA MARIA, 2019; NG, 2010). Durante a cicatrização os mastócitos são fonte e secretam uma série de mediadores que podem contribuir em diferentes eventos deste processo (e.x.: EGF, bFGF, IL-4, VEGF, TGF- $\beta_1$ , histamina, heparina e proteases). Dessa maneira, durante a fase proliferativa, os mastócitos podem induzir a migração e a proliferação de queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, contribuindo com a re-epitelização, a fibrogênese e a angiogênese na ferida (KOMI, KHOMTCHOUK & SANTA MARIA, 2019; NG, 2010)

A angiogênese ocorre a partir da ativação das células endoteliais de vasos pré-existentes, em resposta aos fatores pró-angiogênicos, tais como as citocinas VEGF e FGF. As células ativadas passam a secretar MMPs responsáveis pela degradação da membrana basal, permitindo a formação de brotos capilares na direção do tecido de granulação em formação (CARMELIET & JEIN, 2011; POTENTE & CARMELIET, 2017). O tratamento intradérmico com a jar-C resultou no aumento dos parâmetros associados a este processo, dentre estes o conteúdo de hemoglobina, a média de vasos sanguíneos recém-formados e a síntese das citocinas VEGF e FGF, especialmente após o 3º dia da indução das feridas.

Em um modelo *in vivo* de ensaio de plug de matrigel para análise da angiogênese, os tratamentos com a proteína tipo-disintegrina Alt-C e com um peptídeo sintetizado tendo como base sua sequência, Alt-C PEP, mostraram-se capazes de modular a proliferação de células endoteliais e a formação de novos vasos sanguíneos de maneira dose-dependente, estimulando-as quando nas menores concentrações e inibindo-as em concentrações mais elevadas. Além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrado o aumento da expressão de VEGF e dos receptores para o fator de crescimento do endotélio vascular, VEGFR-1 e VEGFR-2, em células HUVECs após a administração da Alt-C e de ALT-C PEP (RAMOS *et al.*, 2007).

Cominetti e cols. (2004) mostraram que os efeitos pró-angiogênicos, observados após o tratamento com a Alt-C, podem resultar da ativação da integrina  $\alpha_2\beta_1$  pela proteína. A interação entre células endoteliais e a alternagina-C, após um período de incubação de 15 minutos, elevou a fosforilação da via Akt/PKB, efeito similar ao da ativação pelos fatores angiogênicos. Esta via de sinalização, por sua vez, está envolvida com a sobrevivência e a proliferação das células endoteliais. Durante a cicatrização de feridas, Sant'Ana e colaboradores (2008), demonstraram um aumento da densidade capilar nas lesões tratadas com esta mesma proteína. Neste trabalho, os autores demonstraram ainda, uma maior síntese de fatores pró-angiogênicos, como VEGF, FGF-1 e TGF- $\beta_1$ , nos tecidos coletados após o tratamento com a Alt-C e com Alt-C PEP. Já durante a angiogênese inflamatória induzida por implantes subcutâneos de esponjas, a administração diária e intra-implante da SVMP jararagina e da jararagina-C, também resultou no aumento da síntese da citocina VEGF nas amostras coletadas no nono dia após a impantação cirúrgica deste material (FERREIRA *et al.* 2018).

Além da possível modulação da angiogênese pela ativação da integrina  $\alpha_2\beta_1$  após a administração da jar-C, a ativação de células tais como macrófagos e mastócitos, observada nas feridas tratadas com a toxina, também pode estar relacionado com o aumento da angiogênese, pois, como dito anteriormente, estas células são fontes importantes da liberação de mediadores pró-angiogênicos, tais como as citocinas mensuradas.

A fase proliferativa ainda é marcada pela migração e pelo aumento do número de fibroblastos no leito da ferida, evento conhecido como fibroplasia (GREAVES, 2013). A fibroplasia é induzida principalmente pela citocina TGF- $\beta_1$ , que também atua sobre a resolução do processo inflamatório, sobre a síntese de colágeno pelos fibroblastos e na

indução da diferenciação destas células em miofibroblastos, evento importante para a contração das feridas (LEASK & ABRAHAM, 2004). Nos animais tratados com a jararagina-C, com exceção do 7º e do 14º dia após a indução das lesões, os níveis desta citocina estavam mais elevados em comparação ao grupo controle.

A síntese dos componentes de uma nova MEC constitui uma etapa importante do reparo, por fornecer um arcabouço à migração celular e, especialmente graças à deposição de colágeno, por proporcionar resistência às forças de tração que agem sobre a pele (REINKE & SORG, 2012). Nos animais tratados com a jar-C, a deposição de colágeno nas feridas foi sempre maior que a do grupo controle, ao menos até o 10º dia após a lesão. É importante ressaltar, que a quantificação da produção de colágeno solúvel teve, na maior parte do tempo, um comportamento inverso ao do colágeno quantificado nas lâminas histológicas. Possivelmente, os baixos níveis do colágeno solúvel, nas feridas dos animais tratados com a toxina, estão associados a alta deposição deste constituinte no tecido. Já no 14º dia, o remodelamento precoce da MEC, proposto para o tratamento com a jar-C, poderia estar elevando os valores deste marcador, devido à degradação de fibras imaturas (colágeno tipo III).

Na literatura, estudos com a jararagina-C, que avaliaram o efeito desta molécula sobre parâmetros associados com a fibrogênese, também demonstraram sua ação pró-fibrogênica, devido ao aumento da deposição de colágeno e da síntese de TGF- $\beta$ 1 (FERREIRA *et al.*, 2018). Rabelo e cols. (2019), trabalhando com a Alt-C, também demonstraram em sua maior dose de trabalho (1000 ng), um aumento da produção deste constituinte da matriz, em implantes subcutâneos após a administração da toxina.

Em um ensaio *in vitro*, utilizando cultura de fibroblastos da derme humana, Zigrino e cols. (2002) observaram que a ligação da SVMP jararagina a estas células era capaz de mimetizar os efeitos da interação destas com o colágeno fibrilar, induzindo importantes alterações na expressão gênica e na morfologia dos fibroblastos. Recentemente, Argarwal e cols. (2020) demonstraram que a sinalização mediada pela interação do colágeno tipo I junto a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , é importante para a ativação de fibroblastos em resposta ao TGF- $\beta$ 1. Desta maneira, o tratamento com a jar-C poderia estar agindo de modo semelhante à sua molécula precursora, a jararagina, propiciando a ativação de fibroblastos do leito da ferida e estimulando a síntese de colágeno.

Por fim, avaliamos também o grau de maturação do tecido de cicatrização, por meio da quantificação da intensidade em pixels dos tipos de fibras de colágeno depositadas. Durante o reparo tecidual, a formação de uma nova matriz tem início com a deposição de um grande conteúdo de fibras de colágeno do tipo III, que gradualmente são substituídas por colágeno do tipo I, mais resistente (BAUM & ARPEY, 2006; WANG *et al.*, 2018). O tratamento com a jararagina-C favoreceu a deposição precoce e aumentada de fibras de colágeno do tipo I. Em conjunto com os demais dados apresentados até aqui, o remodelamento antecipado dos componentes da matriz, corrobora com nossa hipótese de que a administração desta toxina estaria acelerando e favorecendo o reparo tecidual. Similar aos nossos resultados, Sant'Ana e cols. (2011) também demonstraram o remodelamento precoce dos componentes da MEC, após o tratamento com a Alt-C, com uma deposição acentuada de colágeno tipo I rumo a redução da razão entre estas fibras (III/I), aumentando inclusive a densidade de fibroblastos nas feridas tratadas.

Em resumo, nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar a eficácia do tratamento com a jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina, durante o reparo de feridas cutâneas em camundongos. A administração intradérmica da jar-C foi capaz de acelerar e modular diferentes fases e eventos do processo de cicatrização, incluindo o fechamento da ferida, a produção de mediadores pró-inflamatórios, o infiltrado de leucócitos, a polarização de macrófagos e os parâmetros associados a angiogênese e a síntese e deposição de colágeno. Nossos resultados sugerem que tanto a jar-C, quanto sua integrina alvo,  $\alpha_2\beta_1$ , possam ser exploradas como alternativas terapêuticas ao tratamento de feridas crônicas (ex.: durante o envelhecimento e no diabetes). Para além da cicatrização, os diferentes processos alterados pelo tratamento com a jar-C, também podem ser explorados no estudo de outras patologias, cujos mesmos estejam desregulados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez os efeitos do tratamento intradérmico com a proteína jararagina-C, uma proteína tipo-disintegrina isolada da peçonha de *B. jararaca*, sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. Por meio da avaliação da cinética de cicatrização evidenciamos a ação da jararagina-C sobre as diferentes fases e processos que compõem o reparo tecidual. O tratamento com a toxina foi capaz de acelerar o fechamento das feridas excisionais, atenuando a resposta inflamatória e favorecendo processos necessários ao reparo, tais como a angiogênese, a fibrogênese e o remodelamento da matriz extracelular.

Assim, os dados resultantes desta pesquisa abrem perspectivas para a utilização desta proteína como uma estratégia terapêutica ao tratamento de feridas crônicas. Além disso, ao demonstrarmos a capacidade da jararagina-C de modular processos comuns a outros eventos fisiopatológicos (ex.: inflamação, angiogênese e deposição de colágeno), sinalizamos para a possibilidade de novos trabalhos, focados na administração desta toxina e na avaliação de seus efeitos em diferentes processos patológicos, nos quais tais respostas encontram-se desreguladas.

Por fim, este estudo ainda contribui para uma melhor compreensão da sinalização mediada pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , principal alvo molecular da jararagina-C, cuja ativação é responsável pelo controle de diferentes comportamentos celulares, durante o reparo tecidual.

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

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

ARGAWAL, M.; GOHEEN, M.; JIA, S.; LING, S.; WHITE, E.S.; KIM, K.K. Type I Collagen Signaling Regulates Opposing Fibrotic Pathways through  $\alpha 2\beta 1$  Integrin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 63, n. 5. Pp. 613-622, 2020. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-01500C>

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

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of Wound Care**, v. 22, n. 8, pp. 407-412, 2013. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 78, pp. 352-358, 2005. <https://doi.org/10.1189/jlb.1104682>

BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and Tissue Research**, vol. 339, pp. 269-280, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, pp. 674–686, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31612>

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymology**, v. 162, pp. 327-334, 1988.

BEN-ZIMRA, M, BACHELET, I, SEAF, M, GLEICH, GJ, LEVI-SCHAFFER, F. Eosinophil major basic protein activates human cord blood mast cells primed with fibroblast membranes by integrin- $\beta 1$ . **Allergy**, v. 68, pp.1259– 1268, 2013. <https://doi.org/10.1111/all.12232>.

BERMAN, B.; MADERAL, A.; RAPHAEL, B.; Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. **Dermatological Surgery**, v. 43, n. 1, pp. 3 -18, 2017. <http://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000819>.

BIELEFELD, K.A.; AMINI-NIK, S; ALMAN, B.A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, pp. 2059–2081, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1152-9>.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

BRIAN T. EDELSON, ZHENGZHI LI, LORETTA K. PAPPAN, MARY M. ZUTTER; Mast cell-mediated inflammatory responses require the  $\alpha 2\beta 1$  integrin. **Blood**, v. 103, n. 6, pp. 2214–2220, 2004. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2978>

BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; MACHADO, C. A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. **Clinical Toxicology**, v. 4, n. 3, 2014. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000194>.

BOER, M.; DUCHNIK, E.; MALESZKA, R.; MARCHLEWICZ, M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 33, n. 1, pp. 1-5, 2016. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>.

BOURNAZOU, I.; POUND, J. D.; DUFFIN, R.; BOURNAZOS, S.; MELVILLE, L. A.; BROWN, S. B.; ROSSI, A. G.; GREGORY, C. D. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, pp. 20-32, 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI36226>.

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

CAMPOS, P. P.; ANDRADE, S. P.; MORO, L.; FERREIRA, M. A.; VASCONCELOS, A.C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyetherpolyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, v. 21, n. 12, pp. 1263-1270, 2006. <https://doi.org/10.14670/HH-21.1263>

CANESSO, M.C.; VIEIRA, A.T.; CASTRO, T.B.; SCHIRMER, B.G.; CISALPINO, D.; MARTINS, F.S.; RACHID, M.A.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; BARCELOS, L.S. Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, pp. 5171-5180, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, **Nature**, v. 473, pp. 298 – 307, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10144>

CASSINI-VIEIRA, P.; DECONTE, R. S.; TOMIOSSO, T. C.; CAMPOS, P. P.; MONTENEGRO, C. F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S; BARCELOS, L. S.; ANDRADE, S.P.; ARAÚJO, F. A. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of spongeinduced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicon**, v. 92, pp. 81-89, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007>.

CHA, B.H.; SHIN, S.R.; LEIJTEN, J.; LI, Y.C.; SINGH, S.; LIU, J. C.; ANNABI, N.; ABDI, R.; DOKMECI, M.R.; VRANA, N.E.; GHAEMMAGHAMI, A.M.; KHADEMHOSEINI, A. Integrin-Mediated Interactions Control Macrophage Polarization in 3D Hydrogels. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 21, 2017. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700289>

CHEN, L.; LV, F.; PEI, L. Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 3, pp. 338–347, 2013. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00373.x>.

CIDADE, D.A.P.; SIMÃO, T.A.; DÁVILA, A.M.R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L.; BON C.; ZINGALI, R.B.; ALBANO, R.M. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, n. 4, pp. 437 – 461, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.008>

CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, pp. 1567-1573 2001. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00131-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00131-3)

CLISSA P.B.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M.S.; FARSKY, S.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, n. 5, 591 - 596, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.001>.

COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; RAMOS, O.H.P.; FOX, J.W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Alternagin-C, a Disintegrin-like Protein, Induces Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) Expression and Endothelial Cell Proliferation *in Vitro*. **The Journal of Biobiochemistry**, v. 279, n. 18, pp. 18247-18255. <https://doi:10.1074/jbc.M311771200>

DECLINE F, ROUSSELLE P. Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 4, pp. 811-823, 2001.

DOVI, J.V.; HE, L.-K.; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 73, pp. 448-455. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802406>

DUMIN, J.A.; DICKESON, S.K.; STRICKER, T.P.; BHATTACHARYYA-PAKRASI, M.; ROBY, J.D.; SANTORO, S.A.; PARKS, W.C.; Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. **The Journal of Biobiochemistry**, v. 276, n. 31, pp. 29368 – 29374, 2001. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104179200>.

ECKES B, ZWEERS MC, ZHANG ZG, HALLINGER R, MAUCH C, AUMAILLEY M, KRIEG T. Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 11, n. 1, pp. 66-72, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsymp.5650003>.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 26, pp. 31–37, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005>.

ERICKSON, J.R.; ECHEVERRI, K. Learning from regeneration research organisms: The circuitous road to scar free wound healing. **Developmental Biology**, v. 433, n. 2, pp. 144-154, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.025>.

FALASCA, L.; IADEVAIA, V.; CICCOSANTI, F.; MELINO, G.; SERAFINO, A.; Piacentini, M.; Transglutaminase type II is a key element in the regulation of the anti-inflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment. **Journal of Immunology**, v. 174, pp.7330-7340, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7330>

FERREIRA, B.A.; DECONTE, S.R.; DE MOURA, F.B.R.; TOMIOSSO, T.C.; CLISSA, P.B.; ANDRADE, S.P.; ARAÚJO, F.A. Inflammation, angiogenesis and fibrogenesis are differentially modulated by distinct domains of the snake venom metalloproteinase jararhagin, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, pp. 1179–1187, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.051>

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, pp. 969 – 985, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>

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

FOWLKES, V.; WILSON, C.G.; CARVER, W.; GOLDSMITH, E.V. Mechanical loading promotes mast cell degranulation via RGD -integrin dependent pathways. **Journal of Biomechanics**, v. 46, pp. 788 – 795, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.11.014>

FRANCESCHI, N.; HAMIDI, H.; ALANKO, J.; SAHGAL, P.; IVASKA, J. Integrin traffic – the update. **Journal of cell science**, v. 128, n. 5, pp. 839-852, 2015. <https://doi.org/10.1242/jcs.161653>.

FU, G.; WANG, W.; LUO, B.-H. Overview: Structural Biology of Integrins. **Methods in Molecular Biology**, pp. 81–99. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6\\_7](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_7).

GERMOLEC, D.R.; SHIPKOWSKI, K.A.; FRAWLEY, R.P.; EVANS, E. Markers of Inflammation. **Immunotoxicity Testing**, pp.57–79, 2018. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4\\_5](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5).

GHATAK S, NILAND S, SCHULZ JN, WANG F, EBLE JA, LEITGES M, MAUCH C, KRIEG T, ZIGRINO P, ECKES B. Role of Integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 11, pp. 3011: 3027, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.021>.

GONZALEZ, A.C.; COSTA, T.F.; ANDRADE, Z.A.; MEDRADO, A.R. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, pp.614-620, 2016 <http://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.

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

GREAVES, N.S.; ASHCROFT, K.J.; BAGUNEID, M. BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n.3m pp. 206-217, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>.

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4:93, 2016 <http://doi.org/10.3390/toxins8040093>.

HINZ, B. The role of myofibroblasts in wound healing. **Current Research in Translational Medicine**, v. 64, n. 2, pp. 171-177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.09.003>

HSU, C.C.; CHUANG, W.J.; CHUNG, C.H.; CHANG, C.H.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Snake Venom Disintegrin Inhibits the Activation of Toll-Like Receptors and Alleviates Sepsis through Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 Blockade. **Scientific Reports**, v. 16, n. 6:23387, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23387>.

HU, D. E.; HILEY, C. R.; SMITHER, R. L.; GRESHAM, G. A.; FAN, T. P. Correlation of  $^{133}\text{Xe}$  clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 72, n. 5, pp.601-610, 1995.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; TAKAYASU, T.; IWAKURA, I.; MUKAIDA, N. The Essential Involvement of Cross-Talk between IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the Skin Wound-Healing Process. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 172, pp. 1848-1855, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1848>.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and MS/MS analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, pp. 327–338, 2004. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300628>.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, pp. 447-455, 1979.

KADRY, Y.; CALDERWOOD, D. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1862:183206, 2020. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183206>.

KANNO, E.; TANNO, H.; MASAKI, A.; SASAKI, A.; SATO, N.; GOTO, M.; SHISAI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKAGI, N.; SHOJI, M.; KITAI, Y.; SATO, K.; KASAMATSU, J.; ISHII, K.; MIYASAKA, T.; KAWAKAMI, K.; IMAI, Y.; IWAKURA, Y.; MARUYAMA, R.; TACHI, M.; KAWAKAMI, K. Defect of Interferon  $\gamma$  Leads to Impaired Wound Healing through Prolonged Neutrophilic Inflammatory Response and Enhanced MMP-2 Activation. **International Journal of Molecular Science**, v.1, n. 20(22):5657, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20225657>.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.; RUGMAN, F.P.; WARRELL, D.A.; HAY, C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in

human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. **Toxicon**, v. 29, n.8, pp. 961-972, 1991. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90079-7)

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.G.D.; M. ZUZEL. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, 1996, pp. 627-642. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00017-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00017-7)

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**, v. 209, n 2, pp. 139-151, 2011. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>

KIM, S.Y.; NAIR, M.G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. **Immunology and Cell Biology**. v. 97, n. 3, pp. 258–267, 2015. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>.

KOIVISTO, L.; HEINO, J.; HÄKKINEN, L.; LARJAVA, H. Integrins in Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 3, n. 12, pp. 762–783, 2014. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0436>

KOMI, D.E.A., KHOMTCHOUK, K. & SANTA MARIA, P.L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, pp. 298–312, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>

KOURTZELIS, I.; MITROULIS, I.; VON RENESSE, J.; HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. From leukocyte recruitment to resolution of inflammation: the cardinal role of integrins. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 3, pp. 677-683, 2017. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0117-024R>.

LAURENT, F.; HERMINE, O. Mast cells and inflammation. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 2, pp. 141-145, 2013.

LEASK, A. ABRAHAM, D.J.; TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response, **FASEB Journal**, v.18, pp. 816–827, 2004. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev>

LEY, K.; LAUDANA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, pp. 678-689, 2007. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.

LICHTMAN, M. K.; OTERO-VINAS, M.; FALANGA, V. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 2, pp. 215–222, 2016. <https://doi.org/10.1111/wrr.12398>.

LIND, M.; HAYES, A.; CAPRND, M.; PETROVIC, D.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P.; ZULLI, A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, pp; 370-375, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>.

LOPES, D.S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G.S.; LIMA, I.C.; BALDO, C.; FOX, J.W.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CLISSA, P.B. Gene expression of

inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, pp. 1072-1084, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.004>.

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**, v. 16, pp. 532-548, 2015. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150515125002>

MADAMANCHI, A.; SANTORO, S.A.; ZUTTER, M.M.  $\alpha 2\beta 1$  Integrin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 819, pp. 41-60, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9153-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9153-3_3).

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. 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>.

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

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L. J.; TERRUGGI, C, H, B.; SELISTRE-DEARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; FREITAS, M. S. Alternagin-C, anonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 24, pp. 4799-4808, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03867.x>

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, pp. 428– 435, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140 pp. 771-776, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SINAN. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em 17 de julho de 2020.

MONAVARIAN, M.; KADER, S.; MOEINZADEH, S.; JABBARI, E. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 25, n. 4, pp. 294-311, 2019. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0350>.

MOREIRA, C.; CASSINI-VIEIRA, P.; DA SILVA, M.; BARCELOS, L. da. Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. **BIO-PROTOCOL**, v. 5, n. 22, 2015. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1661>

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 60, n. 3, pp. 280 – 289, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.026>

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A. S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, D. I. ; SHANNON, J. D.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. Evidence for

heterogenous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing snake venom variability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 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)

NG, M.F. The role of mast cells in wound healing. *International Wound Journal*, v. 7 pp. 55–61, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00651.x>

NIKOLOUDAKI, G.; CREBER, K.; HAMILTON, D.W. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 1 n. 318, pp. 1065-1077, 2020. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.000352020>.

NISSINEN, L.; OJALA, M.; LANGEN, B.; DOST, R.; PIHLAVISTO, M.; KÄPYLÄ, J.; MARJAMÄKI, A.; HEINO, J. Sulfonamide inhibitors of  $\alpha 2\beta 1$  integrin reveal the essential role of collagen receptors in in vivo models of inflammation. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 3:e00146, 2015. <https://doi.org.10.1002/prp2.146>.

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

OKONKWO UA, DIPIETRO LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7:1419, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18071419>.

PAINE, M.J.I.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n. 32, pp. 22869 – 22876, 1992.

PETERS, M.A.; WENDHOLT, D.; STRIETHOLT, S.; FRANK, S.; PUNDT, N.; KORB-PAP, A.; JOOSTEN, L.A.; VAN DEN BERG, W.B.; KOLLIAS, G.; ECKES, B.; PAP, T. The loss of  $\alpha 2\beta 1$  integrin suppresses joint inflammation and cartilage destruction in mouse models of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. v. 64, n. 5, pp. 1359-1368, 2012. <https://doi.otg/10.1002/art.33487>.

PHILLIPS, C. L.; PFEIFFER, B. J.; LUGER, A. M.; FRANKLIN, C. L. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney International**., v. 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**, v. 62, n. 4, pp. 510-517, 1990.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n.12, pp. 1063-1072, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.

QIAN, L.W.; FOURCAUDOT, A.B.; YAMANE, K.; YOU, T.; CHAN, R.K.; LEUNG K.P. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 1, pp. 26-34, 2016. <https://doi.org/10.1111/wrr.12381>.

RAMOS, O.H.P.; TERRUGGI, C.H.B.; RIBEIRO, J.U.; COMINETTI, M.R.; FIGUEIREDO, C.C.; BÉRARD, M.; CREPIN, M.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. 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**, v. 461, n. 1, pp. 1-6, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.021>

RABELO, L.F.G.; FERREIRA, B.A.; DECONTE, S.R.; TOMIOSSO, T.C.; dos SANTOS, P. K.; ANDRADE, S.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; ARAÚJO, F.A. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus venom, attenuates inflammation and angiogenesis and stimulates collagen deposition of sponge-induced fibrovascular tissue in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, pp. 653-660, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.171>

RAES, G.; DE BAETSELIER, P.; NOËL, W.; BESCHIN, A.; BROMBACHER, F.; HASSANZADEH, Gh.G. Differential expression of FIZZ1 and Yml in alternatively versus classically activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 4, pp:597-602, 2002.

REINKE J, M.; SORG, H.; Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, pp. 35-43, 2012. <https://doi:10.1159/000339613>

RIBEIRO, C.S.; LEAL, F.; JEUNON, T. Skin Anatomy, Histology, and Physiology. In: Issa M., Tamura B. (eds) **Daily Routine in Cosmetic Dermatology**. Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology, vol 1. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12589-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12589-3_1).

RIDIANDRIES, A.; TAN, J.T.M.; BURSILL, C.A. The Role of Chemokines in Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18; n. 19:3217, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>.

SAN ANTONIO, J.D.; ZOELLER, J.J.; HABURSKY, K.; TURNER, K.; PIMTONG, W.; BURROWS, M.; CHOI, S.; BASRA, S.; BENNETT, J.S.; DEGRADO, W.F.; IOZZO, R.V.; A key role for the integrin alpha2beta1 in experimental and developmental angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 3, pp. 1338-1347, 2009 <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090234>.

SANT'ANA, E.M.C.; GOUVÊA, C.M.C.P.; NAKAIE, C.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. 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**, v. 479, pp. 20-27, 2008. <https://doi:10.1016/j.abb.2008.07.030>

SANT'ANA, E.M.C.; GOUVÊA, C.M.C.P.; DURIGAN, J.L.Q.; COMINETTI, M.R.; PIMENTEL, E.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Rat skin wound healing induced by

alternagin-C, a disintegrin-like, Cys-rich protein from *Bothrops alternatus* venom. **International Wound Journal**, v. 8, pp. 245–252, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00776.x>

SASAKI, K.; TSUJI, T.; JINUSHI, T.; MATSUZAKI, J.; SATO, T.; CHAMOTO, K.; TOGASHI, Y.; KODA, T.; NISHIMURA, T. Differential regulation of VLA-2 expression on Th1 and Th2 cells: a novel marker for the classification of Th subsets. **International Immunology**, v. 15, pp. 701–710, 2003. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg066>

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J.S.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; POZNER, R.G.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 386, n. 4, pp. 369-374, 2005. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.044>.

SCHWENTKER, A.; VODOVOTZ, Y.; WELLER, R.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide**, v. 7, n. 1, pp. 1- 10, 2002. [https://doi.org/10.1016/s1089-8603\(02\)00002-2](https://doi.org/10.1016/s1089-8603(02)00002-2).

SENGER, D.R.; PERRUZZI, C.A.; STREIT, M.; KOTELIANSKY, V.E.; DE FOUGEROLLES, A.R.; DETMAR, M. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, pp. 195-204, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64363-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64363-5).

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

SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, pp. 4111–4126, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1995-y>

SNYDER, R. J., LANTIS, J., KIRSNER, R. S., SHAH, V., MOLYNEAUX, M., & CARTER, M. J. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 4, pp. 613–629, 2016. <https://doi.org/10.1111/wrr.12444>.

SORG, H.; TILKORN, D.J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1, pp. 81-94, 2017. <https://doi.org/10.1159/000454919>.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A.A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of oral and maxillofacial pathology*. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, pp. 251-255, 2012. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>

SUN, B.K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, pp. 941-945. <https://doi.org/10.1126/science.1253836>

SZPADERSKA, A.M.; ZUCKERMAN, J.D.; DIPIETRO, L.A. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 8, pp. 621-626, 2003. <https://doi.org/10.1177/154405910308200810>

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M.S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G.S.; BALDO, C.; CLISSA, P.B.; FERNANDES, I.; MOURA-DASILVA, A. M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to  $\alpha 2\beta 1$  integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, n. 6, pp. 1093–1099, 2010. <https://doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.010>

TIWARI, S.; ASKARI, J. A.; HUMPHRIES, M. J.; BULLEID, N. J. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. **Journal of cell science**, v. 124, pp. 1672–1680, 2011. <https://doi.org/10.1242/jcs.084483>.

TSUNODA, I.; TERRY, E.J.; MARBLE, B.J.; LAZARIDES, E.; WOODS, C.; FUJINAMI, R.S. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by VLA-2 blockade. **Brain Pathology**, v. 17, n. 1, pp. 45-55, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.00042.x>.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K. 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.

VERDERIO, E.A.; JOHNSON, T.; GRIFFIN, M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. **Amino Acids**, v. 26, n. 4, pp.387-404, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0094-4>.

WANG, P.-H.; HUANG, B.-S.; HORNG, H.-C.; YEH, C.-C.; CHEN, Y.-J. Wound Healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, pp. 94-101, 2018.. <https://doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002>

WANG, Z.; PEREZ, M.; LEE, E.S.; KOJIMA, S.; GRIFFIN, M. The functional relationship between transglutaminase 2 and transforming growth factor  $\beta 1$  in the regulation of angiogenesis and endothelial-mesenchymal transition. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 9:e3032, 2017. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.399>.

WERR, J.; JOHANSSON, J.; ERIKSSON, E.E.; HEDQVIST, P.; RUOSLAHTI, E. LINDBOM, L. Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. **Blood**, v. 95, n. 5, pp.1804-1809, 2000.

WILGUS, T.A.; ROY, S. MCDANIEL, J.C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, pp. 379-388, 2013. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0383>.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 4, pp. 406–412, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(02\)00815-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(02)00815-2)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Geneva: WHO; 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Neglected tropical diseases: snakebite envenoming. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/snakebite-envenoming>. Acesso em 10 de julho de 2020.

WYNN, T.A.; VANNELLA, K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, pp. 450-462, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A.K.; ROCHA, M.M.; FURTADO, M.F.; CAMARGO, A.C.; HO, P.L.; SERRANO, S.M.; Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, pp. 2278-2291, 2010. <https://doi.org/10.1021/pr901027r>.

ZELTZ C, GULLBERG D. The integrin-collagen connection--a glue for tissue repair? **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 4, pp. 653-664, 2016. <https://doi.org/10.1242/jcs.180992>.

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, n. 12:2085, 2016. <http://doi.org/10.3390/ijms17122085>.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J.W.; MAUCH, C. The Reprolysin Jararhagin, a Snake Venom Metalloproteinase, Functions as a Fibrillar Collagen Agonist Involved in Fibroblast Cell Adhesion and Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, pp. 40528–40535, 2002. <https://doi:10.1074/jbc.M202049200>

ZOMER, H.D.; TRENTIN, A.G.; Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal of Dermatological Science**. v. 90, n. 1, pp. 3-12, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>.

ZWEERS MC, DAVIDSON JM, POZZI A, HALLINGER R, JANZ K, QUONDAMATTEO F, LEUTGEB B, KRIEG T, ECKES B. Integrin alpha2beta1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 2, pp.467-478, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700546>.

ZYCHAR, B.C.; CLISSA, P.B; CARVALHO, E. BALDO, C.; GONÇALVES, L.R.C. Leukocyte recruitment induced by snake venom metalloproteinases: Role of the catalytic domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 521, n. 2, pp. 402-407, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.144>.

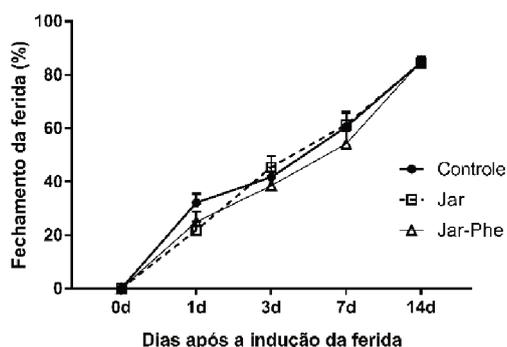
## APÊNDICE

Além de demonstrarmos os efeitos do tratamento intradérmico com a proteína *tipo-disintegrina* Jararagina-C (Jar-C), também utilizamos do mesmo delineamento experimental para avaliarmos os possíveis efeitos Jararagina (Jar), metaloproteinase precursora da Jar-C, e da Jar-Phe, molécula cujo domínio catalítico metaloproteinase foi inativado pelo agente quelante 1,10-fenantrolina. Foram administrados 400 ng de cada um destes compostos por ferida, determinados com base em nosso trabalho anterior (FERREIRA *et al.*,2018). Os resultados demonstram que a simples presença do domínio metaloproteinase na estrutura destas toxinas, independente da presença de sua atividade catalítica, foi capaz de modular de forma diferente os eventos associados a cicatrização de feridas, não promovendo uma melhora significativa na velocidade da cicatrização, como observado após o tratamento com a Jar-C.

## RESULTADOS

### *Fechamento das feridas*

A velocidade de fechamento das feridas tratadas tanto com a Jararagina, quanto com a Jar-Phe, não diferiu do fechamento observado nas feridas do grupo controle, como observado na Fig. A-1 deste material.

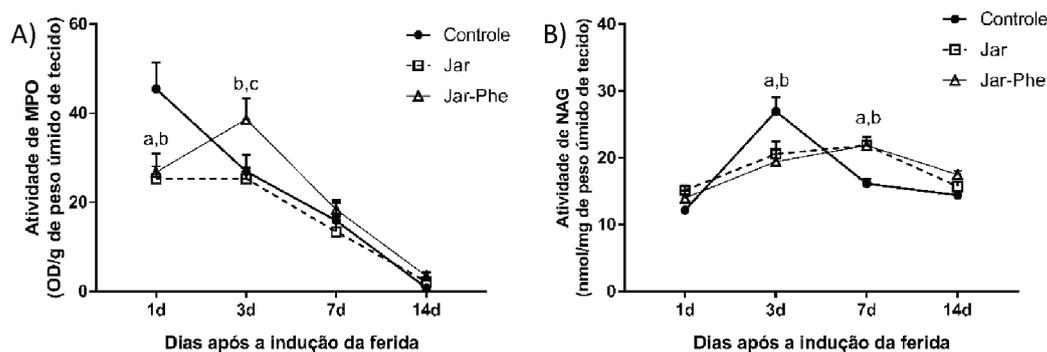


**Figura A-1: Efeito do tratamento intradérmico com a toxinas Jar e Jar-Phe, durante a cicatrização de feridas excisionais.**

Representação gráfica da porcentagem de fechamento das feridas. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m., n = 8-10 camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle (2-way ANOVA).

*Avaliação do perfil de leucócitos observados nas feridas após o tratamento com as toxinas.*

A presença de neutrófilos junto ao leito das feridas foi avaliada por meio da mensuração bioquímica da atividade da enzima MPO. Assim como observado durante o tratamento com a Jar-C, a presença destas células nas primeiras 24 horas do processo de cicatrização foi atenuada pelo tratamento com as toxinas. Entretanto, no 3º dia após a indução das lesões, observamos no grupo tratado com a Jar-Phe, um maior acúmulo destes leucócitos na área da lesão. O conteúdo de macrófagos por sua vez foi indiretamente mensurado por meio da avaliação bioquímica da atividade da enzima NAG (Figura A-2). O tratamento tanto com a Jar, quanto com a Jar-Phe, não foi capaz de incitar um maior acúmulo deste tipo celular logo nas primeiras horas da cicatrização, como observado após a aplicação intradérmica da Jar-C.



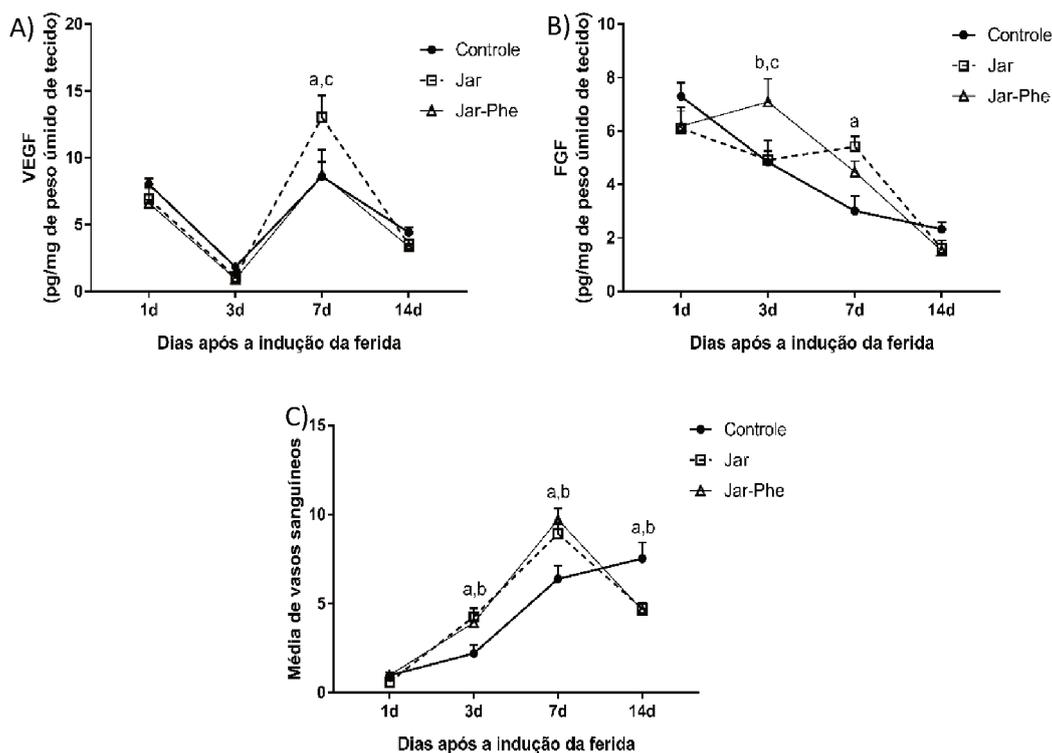
**Figura A-2: Perfil do infiltrado de leucocitário nas feridas de camundongos tratados com a Jar e a Jar-Phe, durante o processo de cicatrização.**

Mensuração da atividade das enzimas (A) mieloperoxidase (MPO) e (B) N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), marcadores indiretos do conteúdo de neutrófilos e macrófagos, nas feridas de animais do grupo controle (PBS), ou tratados com as proteínas Jar e Jar-Phe, em diferentes intervalos de tempo após a indução das lesões. Os dados foram apresentados como a média ± e.p.m., n = 8-10 camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. a – Diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar; b – diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar-Phe; c – diferença entre os tratamentos Jar e Jar-Phe. (p < 0,05; 2-way ANOVA).

*Efeitos do tratamento intradérmico com as toxinas sobre os componentes angiogênico associado à cicatrização.*

Assim como observado no tratamento com Jar-C, a administração intradérmica da Jar e da Jar-Phe foi capaz de incitar a angiogênese, ao menos até o 7ª dia do processo de cicatrização. Neste intervalo, o tratamento com estes compostos foi capaz de incitar a

produção de fatores pró-angiogênicos, como a síntese das citocinas VEGF e FGF, e a formação de novos vasos sanguíneos. Contudo esse perfil não foi mantido até o final do período experimental, com uma redução nestes parâmetros durante o 14º dia após a indução das feridas (Figura A-3).



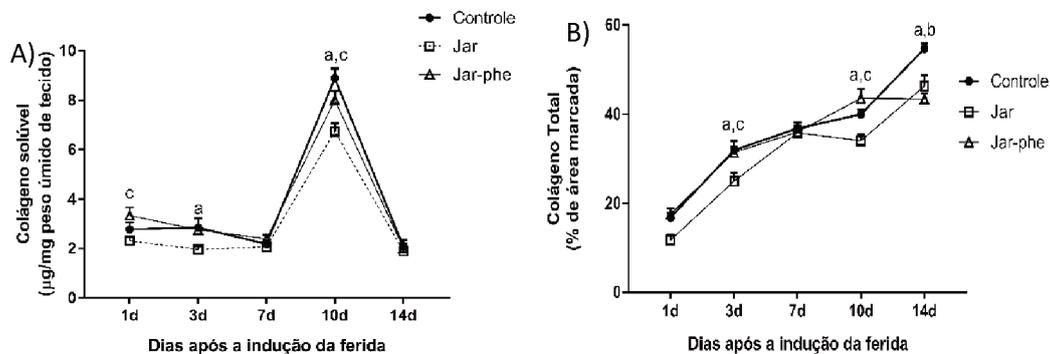
**Figura A-3: Cinética dos parâmetros associados ao processo de angiogênese, avaliados após o tratamento com as toxinas Jar e Jar-Phe, durante a cicatrização de feridas excisionais em camundongos.**

Cinética da síntese das citocinas pró-angiogênicas (A) VEGF e (B) FGF, avaliadas por meio de ELISA. (C) Média de vasos sanguíneos observados nas secções histológicas coradas com tricrômico de gomori, durante a cinética de cicatrização nos grupos controle (PBS) e tratado com a Jar ou a Jar-Phe. Os dados foram apresentados como a média ± e.p.m., n = 8-10 camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. a – Diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar; b – diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar-Phe; c – diferença entre os tratamentos Jar e Jar-Phe. (p < 0,05; 2-way ANOVA).

*O tratamento com as toxinas foi capaz de inibir a síntese e a deposição de colágeno durante o processo de cicatrização das feridas excisionais.*

Enquanto o tratamento com a Jar-C se mostrou extremamente capaz de incitar o processo de fibrogênese, com conseqüente deposição de colágeno, a aplicação tanto da

Jar, quanto da Jar-Phe, resultou em uma redução dos da síntese e da deposição deste importante constituinte da matriz extracelular (Figura A-4).



**Figura A-4: Cinética dos parâmetros associados a deposição de colágeno, avaliados após o tratamento com as toxinas Jar e Jar-Phe, durante o processo de cicatrização.**

(A) Mensuração da concentração de colágeno solúvel durante a cinética de cicatrização nos grupos controle (PBS) e tratados (Jar ou Jar-Phe). (B) Quantificação da área marcada nos cortes corados com *picrosirius red*, correspondente ao colágeno depositado, durante o intervalo de tempo avaliado. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 8-10$  camundongos por grupo, para cada intervalo de tempo avaliado. a – Diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar; b – diferença entre os tratamentos controle (PBS) e Jar-Phe; c – diferença entre os tratamentos Jar e Jar-Phe. ( $p < 0,05$ ; 2-way ANOVA).

ANEXO 1  
**Certificado CEUA-UFU**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação dos efeitos da jararagina-C, uma toxina tipo-desintegrina, na cicatrização de feridas em camundongos”, protocolo nº 085/16, sob a responsabilidade de **Fernanda de Assis Araújo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **14 de outubro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Avaliação dos efeitos da jararagina-C, uma toxina tipo-desintegrina, na cicatrização de feridas em camundongos", protocol 085/16, under the responsibility of Fernanda de Assis Araújo - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of October 14th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/16 Término: 01/03/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo heterogênico Swiss
Número de animais	280
Peso / Idade	30-35g / 7 - 8
Sexo	Machos
Origem / Local	CBEA – UFU / ARFIS
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de outubro de 2016.

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