

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUIS FERNANDO GONÇALVES RABELO

.

Avaliação da atividade da Alternagina - C na inflamação crônica em camundongos

UBERLÂNDIA

2015

LUIS FERNANDO GONÇALVES RABELO

Avaliação da atividade da Alternagina - C na inflamação crônica em camundongos

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

Orientadora: Dra. Fernanda de Assis Araújo

Co-orientador: Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

UBERLÂNDIA

2015

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

---

R114a Rabelo, Luis Fernando Gonçalves, 1971  
2015 Avaliação da atividade da Alternagina - C na inflamação crônica em camundongos [recurso eletrônico] / Luis Fernando Gonçalves Rabelo. - 2015.

Orientadora: Fernanda de Assis Araújo.

Coorientadora: Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1325>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Inflamação. 3. Neovascularização. 4. Doenças crônicas. I. Araújo, Fernanda de Assis, 1976, (Orient.). II. Araújo, Heloisa Sobreiro Selistre de, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



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

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número 036/2014 do PPGBC

Data: 20 de março de 2015

Discente: Luís Fernando Gonçalves Rabelo

Matrícula nº. 11312BCE006

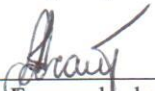
Título do Trabalho: "Avaliação da atividade da Alternagina – C na angiogênese inflamatória em camundongos".

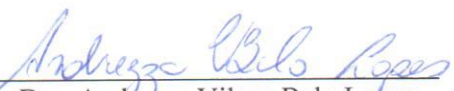
Às quatorze horas do dia vinte de março de 2015 no Laboratório de Práticas Virtuais – Bloco 2A - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila/UFU, Andrezza Vilaça Belo Lopes/UFMG e Fernanda de Assis Araújo/UFU, orientadora do candidato. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato Luís Fernando Gonçalves Rabelo; agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

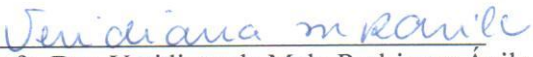
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Luís Fernando Gonçalves Rabelo aprovado

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

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16:35hs. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fernanda de Assis Araújo  
UFU

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Andrezza Vilaça Belo Lopes  
UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila  
UFU

Ata da defesa

Dedico este trabalho a minha mãe Genny e ao meu pai Joaquim, e também à professora Fernanda, grande incentivadora de pessoas.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança, a sua melhor amiga; da experiência, o seu sábio conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo guardião.”

**Joseph Addison**

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho, não é uma conquista individual, mas sim um trabalho em conjunto com professores, amigos, colegas, técnicos laboratoriais, profissionais da área da saúde e bibliotecários. Portanto, agradecer é, sobretudo, reconhecer o papel e o valor daqueles com quem compartilhamos nossas experiências, nossos conhecimentos e nossas buscas,

É importante agradecer em primeiro lugar a Deus por me dar forças para superar as dificuldades, enfrentar a dura caminhada em busca de novos conhecimentos que possam me levar às novas experiências que o mundo me proporcionar.

À minha família, eterna companheira de grandes lutas, pelo amor, incentivo e paciência durante os momentos de ausência e de muito trabalho.

Agradeço aos meus pais que acreditaram em mim e por toda compreensão e carinho. São eles quem me deram toda a base para ser o que sou hoje.

À minha orientadora e professora Fernanda, que admiro muito e me deu a grande oportunidade de retomar meus estudos, após longo período de 10 anos. Pela dedicação e paciência nos atendimentos, disponibilizando de seu tempo tão precioso; o que levou ao desenvolvimento de muitas ideias, necessárias para a realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Heloisa Selistre de Araújo, pelo cordial convite para participar de treinamentos na UFSCAR nos processos de purificação proteica, e também a Dr<sup>a</sup> Livia que teve toda disponibilidade e boa vontade na aplicação das técnicas laboratoriais de purificação proteica, que foram fundamentais na realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Simone Ramos Deconte, amiga e colega de trabalho muito especial e querida pra mim; ajudou muito, em diversas técnicas, procedimentos laboratoriais e muitas outras coisas, além do apoio emocional nas horas que mais precisei, e também aos meus queridos amigos e colegas de laboratório: Anderson, Bruno, Puebla, Ricardo, grandes amigos!!

À professora Dr<sup>a</sup> Tatiana Tomiosso, com quem fiz três disciplinas, o estágio docência, e sempre admirei a sua paixão na biologia celular.

Ao coordenador Dr<sup>o</sup> Paulo Rogério que participou das apresentações semestrais do projeto, e pode colaborar com sugestões e opiniões durante a realização do trabalho.

Aos demais professores do programa de pós graduação em biologia celular da UFU, que contribuíram para minha formação e para meus conhecimentos.



A todos os servidores da UFU, pelos serviços prestados, pela gentileza e pela amizade.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e conclusão deste estudo.

A todos, muito obrigado.

## RESUMO

A inflamação e a angiogênese atuam concomitantemente em diversas doenças crônicas. A maior parte destes processos são mediados através da interação entre a matriz extracelular e os receptores de integrina. A Alternagina-C (ALT-C) é uma proteína tipo desintegrina, derivada do veneno da serpente *Bothrops alternatus*. Estudos com a ALT-C mostraram efeitos na adesão celular mediada por colágeno tipo I e a capacidade de modular via integrina  $\alpha 2\beta 1$  diversos fatores de crescimento. Nosso objetivo foi investigar os efeitos da ALT-C em componentes chaves da angiogênese inflamatória induzida pelo modelo de implantes sintéticos de esponja em camundongos. O tratamento com ALT-C inibiu os principais componentes do tecido fibrovascular (inflamação e angiogênese) induzido pelos implantes sintéticos subcutâneos, e aumentou a fibrogênese. Efeitos anti-inflamatórios foram observados através da inibição de mastócitos e de NAG (atividade de macrófagos), e também pela inibição da citocina TNF- $\alpha$  e das quimiocinas MCP-1 e CXCL-1. A redução do conteúdo de hemoglobina, número de vasos e das concentrações das citocinas VEGF e FGF mostraram que a ALT-C é também anti-angiogênica. Todos esses fatores revelam que a ALT-C é uma forte candidata no desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias e anti-angiogênicas em processos inflamatórios crônicos.

**Palavras chaves:** Inflamação, angiogênese, integrinas, desintegrinas.

## ABSTRACT

Inflammation and angiogenesis act concomitantly in several chronic diseases. Most of steps of these processes are mediated by integration between extracellular matrix and integrin receptors. Alternagin-C (ALT-C), is a disintegrin-like derived from the venom of *Bothrops alternatus*. Studies with ALT-C have showed effects in cell adhesion mediated by collagen type I and ability of modulate growth factors associated integrin  $\alpha 2\beta 1$ . Our aim was to investigate the effects of ALT-C on key components of inflammatory angiogenesis in the murine sponge model. Polyester-polyurethane sponges, used as framework for fibrovascular tissue growth, were implanted in Balb/c mice. Treatment with ALT-C inhibited the main components keys fibrovascular tissue (inflammation and angiogenesis) induced by synthetic subcutaneous implants and also changing the fibrogenic component. Anti-inflammatory effects were observed by inhibition of mast cell and NAG (macrophage activity), and also by the inhibition of cytokines TNF- $\alpha$  and MCP-1 and chemokine CXCL-1. The reduction in hemoglobin content, number of vessels and the concentrations of VEGF and FGF cytokines, have shown that ALT-C is also anti-angiogenic. All these factors show that Alt-C is a strong candidate for the development of anti-inflammatory and anti-angiogenic therapies.

**Keywords:** Inflammation, angiogenesis, integrin, disintegrin,

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BSA</b>	Soro fetal bovino
<b>CCL2/JE/MCP-1</b>	Quimiocina CC ligante 2/ Proteína quimiotática para o monócito – 1 (MCP-1)
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CXC</b>	Grupo de quimiocinas com uma cisteína entre os dois resíduos amino-terminais
<b>CXCL-1/KC</b>	Quimiocina motivo CXC ligante 1 / Quimiocina derivada de queratinócito
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água destilada
<b>DMEM</b>	Meio Dulbecco Mem
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked ImmunoSobernt Assay</i>
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FAK</b>	Quinase de adesão focal (Focal adhesion kinase)
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblático
<b>H.E.</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>H1F1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HTAB</b>	Hexadecil trimetil brometo de amônio
<b>HUVEC</b>	Células endoteliais humanas de cordão umbilical
<b>ICAM</b>	Membro da superfamília de imunoglobulinas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>Mili-Q H<sub>2</sub>O</b>	Água ultra pura
<b>mL</b>	Mililitros

<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>MPO</b>	Enzima Mieloperoxidase
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>SVMP</b>	Metaloproteinases de veneno de serpentes
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	Componentes da via inflamatória .....	16
<b>FIGURA 2</b>	Etapas do processo de migração celular .....	17
<b>FIGURA 3</b>	Interação celular durante a resolução da inflamação .....	18
<b>FIGURA 4</b>	Etapas da angiogênese .....	22
<b>FIGURA 5</b>	Matriz extracelular .....	25
<b>FIGURA 6</b>	Diagrama representando a variedade de integrinas .....	26
<b>FIGURA 7</b>	Composição do veneno da <i>Bothrops alternatus</i> .....	29
<b>FIGURA 8</b>	Efeitos das desintegrinas .....	31
<b>FIGURA 9</b>	Modelo experimental .....	33
<b>FIGURA 10</b>	Cortes histológicos coloração tricrômico de gomori .....	50
<b>FIGURA 11</b>	Cortes histológicos coloração picrosirius .....	55
<b>GRÁFICO 1</b>	Efeitos da ALT-C no peso úmido .....	44
<b>GRÁFICO 2</b>	Efeitos da ALT-C na concentração de TNF- $\alpha$ .....	44
<b>GRÁFICO 3</b>	Efeitos da ALT-C na atividade de MPO .....	45
<b>GRÁFICO 4</b>	Efeitos da ALT-C na quimiocina CXCL1/KC .....	45
<b>GRÁFICO 5</b>	Efeitos da ALT-C na atividade enzimática NAG .....	46
<b>GRÁFICO 6</b>	Efeitos da ALT-C na quimiocina CCL-2/JE/MCP-1 .....	46
<b>GRÁFICO 7</b>	Efeitos da ALT-C na quantidade de mastócitos .....	47
<b>GRÁFICO 8</b>	Efeitos da ALT-C na concentração de hemoglobina .....	49
<b>GRÁFICO 9</b>	Número de vasos/área total .....	51
<b>GRÁFICO 10</b>	Efeitos da ALT-C na concentração de VEGF .....	51
<b>GRÁFICO 11</b>	Efeitos da ALT-C na concentração de FGF .....	52
<b>GRÁFICO 12</b>	Efeitos da ALT-C na concentração de colágeno solúvel .....	54

<b>GRÁFICO 13</b> Efeitos da ALT-C na deposição de colágeno total .....	56
<b>GRÁFICO 14</b> Efeitos da ALT-C na concentração de TGF- $\beta$ .....	56

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Inflamação .....	15
1.2 Angiogênese .....	20
1.3 Matriz Extracelular e integrinas .....	24
1.4 Desintegrina ALT-C e venenode serpentes.....	28
1.5 Implantes sintéticos (modelo experimental) .....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	42
4.1 Efeitos da ALT-C sobre o infiltrado tecidual no modelo de esponja.....	42
4.2 Efeitos da ALT-C na inflamação.....	42
4.3 Efeitos da ALT-C na Angiogênese.....	48
4.4 Efeitos da ALT-C sobre a deposição de colágeno .....	53
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65



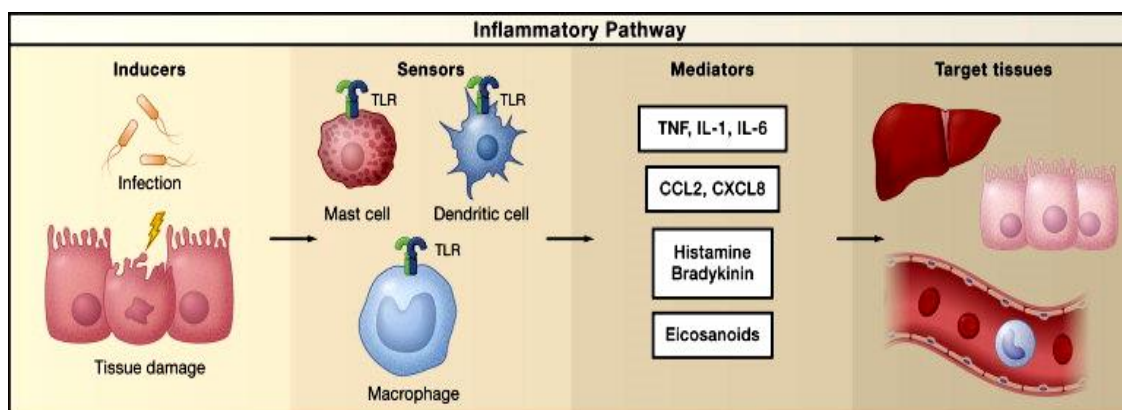
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta fundamental na sobrevivência do organismo durante a infecção ou lesão, mantendo a homeostase dos tecidos (MEDZHITTOV, 2010). A resposta inflamatória é conhecida pela humanidade desde o século I dC, quando o médico romano Cornélio Celsus descreveu seus sinais e sintomas, conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: dor, calor, rubor e tumor (MAJNO, 1975). Um quinto sinal foi adicionado em 1850 por Rudolf Virchow, referindo-se à perda da função (*functio laesa*) devido às disfunções dos órgãos envolvidos no processo.

Uma resposta inflamatória típica é resumidamente constituída por quatro componentes: os indutores inflamatórios, os sensores de detecção, os mediadores inflamatórios e o tecido alvo. Cada componente tem várias formas e suas combinações funcionam em vias inflamatórias diferentes, e, o tipo de via induzida em determinadas condições depende da natureza do gatilho inflamatório. A resposta inflamatória pode ser iniciada por diversos agentes nocivos como: trauma, necrose tecidual, corpo estranho, microrganismos os quais são detectados pelo sistema imune inato, induzindo macrófagos, mastócitos e células dendríticas residentes a produzir diversos mediadores pró-inflamatórias como a TNF- $\alpha$ , interleucinas e quimiocinas como as CCL2 e CXCL (MEDZHITOV, 2010)

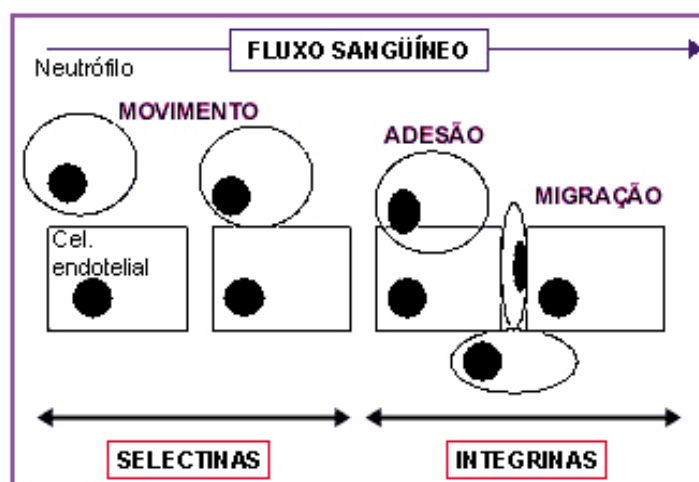
Os mastócitos são importantes células da imunidade inata, residentes em diversos tecidos e são muito estudados em processos alérgicos e doenças auto-imunes, pois podem ser ativados por receptores de imunoglobulinas. No entanto, os mastócitos presentes em tecidos inflamados também expressam em grande quantidade integrinas e assim podem ser ativados e induzidos a liberar diversos fatores pro-inflamatórios. Os receptores e ligantes que medeiam essas células ainda são pouco compreendidos. Mastócitos peritoneais por exemplo, requerem a expressão das integrinas  $\alpha 2\beta 1$  para ativação em respostas a agentes patológicos, mas o mecanismo que faz essa integrina induzir a secreção e ativação de citocinas ainda não é bem conhecida (EDELSON *et al.*, 2006) (Figura 1).



**Figura 1: Componentes da via inflamatória.** A via inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores e tecidos-alvo. Indutores iniciam a resposta inflamatória e são detectados por sensores. Sensores, tais como receptores semelhantes a Toll (TLRs), são expressas em células especializadas, tais como os macrófagos do tecido residente, células dendríticas e mastócitos. Eles induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas, eicosanóides bioativos, e produtos de cascatas proteolíticas, tais como bradicinina. Estes mediadores inflamatórios agem em vários tecidos-alvo para provocar alterações nos seus estados funcionais que otimizam a adaptação à condição nociva (por exemplo, infecção ou lesão do tecido) associado com os indutores específicos que despertaram a resposta inflamatória. Os componentes específicos apresentados representam apenas uma pequena amostra de uma miríade de diferentes sensores, mediadores, e os tecidos-alvo envolvidas na resposta inflamatória. Figura extraída de MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell, v. 140, n.6, p.771-776, 2010.

Basicamente, a inflamação pode ser caracterizada como aguda ou crônica. A inflamação aguda se inicia em alguns segundos ou minutos após a agressão, tem curta duração, e suas principais características são: a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema), e a migração leucocitária predominante de polimorfonucleares (neutrófilos) para o sítio inflamatório, atraídos por diversos mediadores moleculares sintetizados inicialmente por células residentes (OKIN & MEDZHITOV, 2012), que vão atuar em diversos componentes e também na microcirculação local permitindo a interação de leucócitos com células endoteliais, que são mediadas principalmente por integrinas e selectinas (LEY, 2007) (Figura 2). A quimiocina CXCL-1, é essencial no recrutamento de neutrófilos, os quais produzem principalmente a enzima mieloperoxidase (MPO), importante enzima presente em leucócitos da linhagem granulocítica, catalisando a formação de numerosas espécies reativas do oxigênio, destruindo assim, os patógenos invasores (BURG *et al.*, 2001). Já os macrófagos possuem uma grande plasticidade, podendo assumir funcionalmente dois fenótipos: o macrófago de fase inflamatória (M1) e de fase resolutive (M2). No processo de resolução da inflamação aguda, os neutrófilos, após realizar sua ação local, entram em apoptose e logo em seguida os macrófagos de fase inflamatória (M1) fagocitam esses neutrófilos apoptóticos (esferocitose), e assim

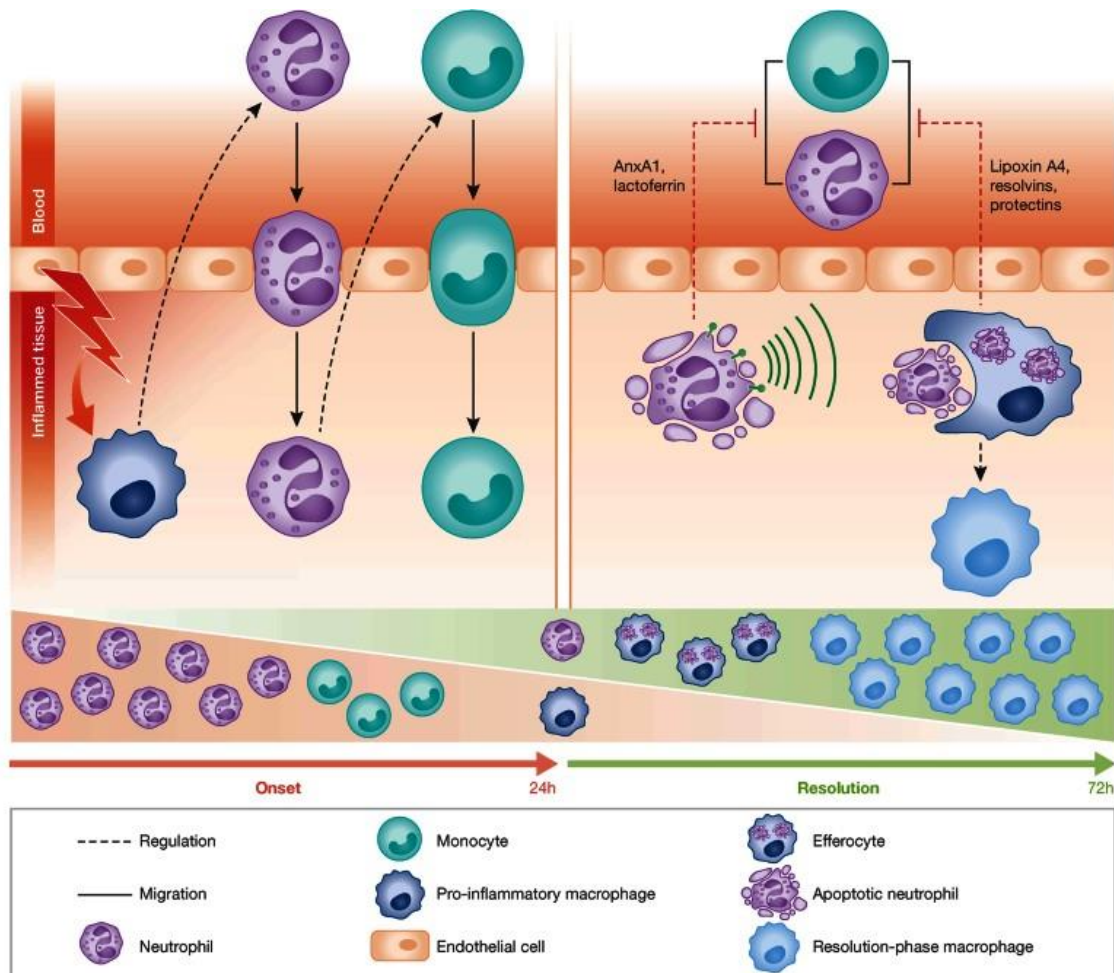
promovem alterações no fenótipo do macrófago (M1) para macrófago de fase resolutive (M2) (ORTEGA-GOMEZ, 2013). No entanto, se ocorrer um insucesso na eliminação do agente lesivo, e o estímulo permanecer, a inflamação pode se tornar crônica, aumentando leucócitos mononucleares no local, estimulando a síntese e deposição de matriz extracelular e a angiogênese (JACKSON *et al.*, 1997).



**Figura 2: Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para o sítio inflamatório.** Os leucócitos rolam na superfície do endotélio, depois são ativados, aderindo a ele através das selectinas e integrinas, permitindo assim a transmigração através do endotélio (diapedese), atravessando a membrana basal e migram seguindo um gradiente quimiotático que se origina no local da lesão. Várias moléculas tem papel fundamental nas diversas etapas desse processo – as selectinas, no rolamento, as quimiocinas, ativando os leucócitos para aumentar sua avides pelas integrinas e a integrinas na forte adesão celular. Figura extraída de: SAVARIS, Neverton. Resposta imunoinflamatória à circulação extracorpórea: estado atual. **Rev. bras. anestesiol**, v. 48, n. 2, p. 126-36, 1998.

Na inflamação crônica os leucócitos mononucleares como linfócitos e macrófagos são predominantes. Os monócitos circulantes são recrutados por quimiocinas como a CCL-2/JE/MCP-1 (proteínas quimiotáticas de monócitos-1), produzidas por células residentes, e ao chegarem no tecido lesionado se tornam macrófagos ativos (HASKÓ & PANHER 2012). Os macrófagos podem ter dois fenótipos, M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório de fase resolutive), sendo que o primeiro atua principalmente nos processos de defesa na fase

inflamatória, eliminando agentes lesivos; e o segundo atua na fase resolutive, ou seja, no processo de reparo tecidual (MOELLER, 2009) (Figura 3).



**Figura 3: Interação celular durante a inflamação e resolução.** Visão geral dos processos celulares durante o início (à esquerda) e resolução (à direita) da inflamação. Durante a fase inicial as células residentes do tecido inflamado percebem danos e iniciam a liberação de sinais que induzem neutrófilos rapidamente para o sítio inflamatório e diminuem a migração de monócitos. A resolução é iniciada quando os neutrófilos apoptóticos se tornam mediadores e são fagocitados por macrófagos e estes assumem um fenótipo M2, expressando citocinas anti-inflamatórias, promovendo a homeostase do tecido. ORTEGA-GOMEZ *et al.* Resolution of inflammation. EMBO Molecular Medicine, p. 664, 2013.

Macrófagos ativos sintetizam a enzima lisossomal NAG (N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase) em altas concentrações a qual atua principalmente na destruição de agentes lesivos na inflamação (PERES *et al.*, 2013). Os macrófagos de fase resolutive (M2), em condições fisiológicas, substituem, após 24-72 horas do início da inflamação os neutrófilos e macrófagos da fase inflamatória (M1). Os M2 secretam grande quantidade de mediadores pró-resolutivos como o TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador) que em condições normais sobrepõe os mediadores pró-inflamatórios na fase de resolução, estimulando a deposição de colágeno, proteoglicanos e fibronectina. O VEGF (fator de crescimento endotelial) e o FGF (fator de crescimento de fibroblastos) são dois importantes fatores de crescimento no processo de reparo tecidual induzindo a angiogênese durante a fase proliferativa e cicatrização de feridas (LIU *et al.*, 2014; NISSEN *et al.*, 1998).

Os mastócitos são importantes células da imunidade inata, sendo muito estudados em processos alérgicos e doenças auto-imunes, pois podem ser ativados por receptores de imunoglobulinas, no entanto, os mastócitos também são ativados em processos inflamatórios por integrinas. Os receptores e ligantes que medeiam essas células ainda são pouco compreendidos. Mastócitos peritoneais requerem a expressão das integrinas  $\alpha 2\beta 1$  para ativação em respostas a agentes patológicos, mas o mecanismo que faz essa integrina induzir a secreção e ativação de citocinas ainda não é bem conhecida (EDELSON *et al.*, 2006)

A angiogênese é um evento fisiológico nos processos inflamatórios, pois, permite o aporte de oxigênio, nutrientes e também um aumento do infiltrado inflamatório. No entanto, favorece maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas, podendo formar uma espécie de ciclo vicioso e patológico, onde a angiogênese estimula a inflamação e vice versa (COSTA, 2007).

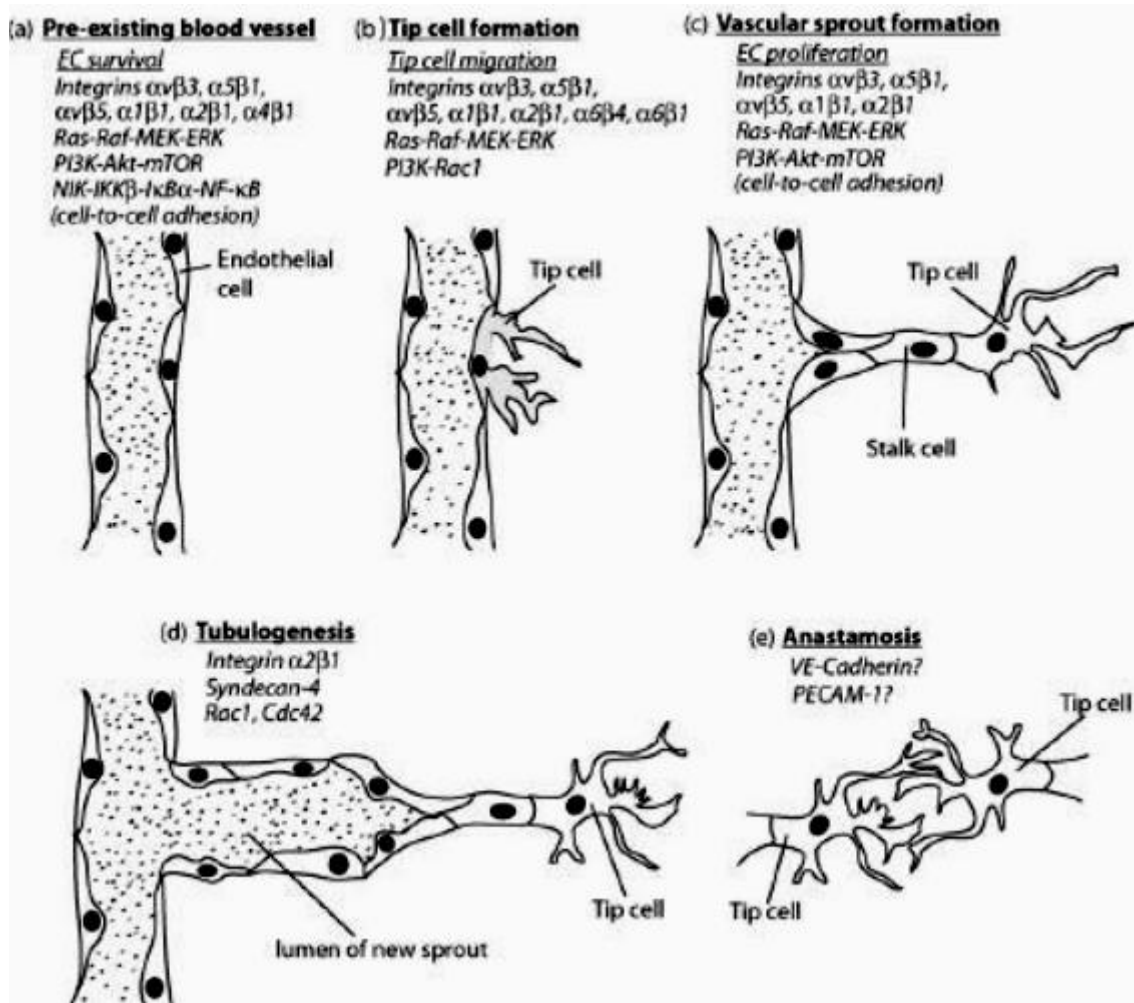
## 1.2 Angiogênese

A angiogênese é um processo biológico complexo que envolve várias reações inter-relacionadas em diferentes etapas, e é regulada por vários fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, tais como a fibronectina e as integrinas (SENGER & DAVIS, 2011; CHAVAKIS, 2004). Processos inflamatórios e angiogênese são frequentemente associados em situações patológicas, uma vez que, respostas inflamatórias aumentam a permeabilidade capilar e induz a ativação endotelial e, quando persistentes, resultam na proliferação e crescimento vascular (ARROYO & IRUELA-ARISPE, 2010). Fundamental na regulação e manutenção dos processos fisiológicos do reparo tecidual, da reprodução e do desenvolvimento celular, a angiogênese é finamente regulada perante estas condições e a vasculatura se mantém em estágio quiescente, podendo ser estimulada e ativada a qualquer momento (CARMELIET, 2005).

As células necessitam de um suprimento confiável e finamente controlado de oxigênio, e a angiogênese pode assegurar que todas as células estão dentro da distância ideal de suprimento de oxigênio (HOEBEN, LANDUYT *et al.* 2004). A angiogênese é controlada por um equilíbrio entre fatores pró-angiogênicos (integrinas, VEGF, óxido nítrico, TGF- $\beta$ , FGF, metaloproteinases de matriz e CCL/JE/MCP-1), e anti-angiogênicos (inibidores de metaloproteinases, trombospondina, angiotatins e outros), ou seja, um equilíbrio fisiológico entre sinais que estimulam e inibem o crescimento de vasos sanguíneos, e, uma mudança no fenótipo angiogênico é dependente de alterações locais no equilíbrio entre estimuladores e inibidores angiogênicos (MUNDEL, 2007).

Várias condições de estresse podem influenciar a angiogênese aumentando a disponibilidade de proteínas pró-angiogênicas, por exemplo, na hipóxia, ocorre a liberação do fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF1 $\alpha$ ), este estimula o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual é um forte indutor da angiogênese (AHLUWALIA & TARNAWSKI, 2012). O VEGF é um dos principais fatores de crescimento relacionado à angiogênese, devido sua habilidade em promover a vasodilatação via produção de óxido nítrico (NO) endotelial, permitindo o aumento na permeabilidade das células endoteliais (ZICHE *et al.*, 1997).

O brotamento endotelial é uma das principais formas de vascularização, envolvendo primeiramente a invasão de áreas avasculares através da proliferação e migração de células endoteliais. Dois diferentes tipos de células endoteliais podem participar desse processo: as *tip cell*, tipo celular que apresenta filópodos os quais se orientam em direção ao estímulo angiogênico e são essenciais para o brotamento vascular e regulação de diversos estímulos inflamatórios; e as *stalk cell* que se encontram próximas às *tip cell* e são células altamente proliferativas responsáveis pela formação do lúmen do vaso. Em cada fase estas células expressam integrinas e secretam proteases específicas que permitem a migração e invasão através de diferentes barreiras teciduais encontradas, tais como a membrana basal, matriz extracelular e a matriz provisória constituída de fibrina em resposta ao aumento da permeabilidade vascular (DE SNET *et al.*, 2009) (figura 4).



**Figura 4: Etapas da angiogênese** – (A) estado de quiescência do vaso sanguíneo e de suas células endoteliais. (B) Ativação da célula endotelial que passa a ser chamada de *tip cell*. (C) As *stalk cells* em proliferação, próximas as *tip cells*. (D) O lúmen do vaso é formado através da fusão das *stalk cells*. (E) A *tip cell* de um vaso se funde a *tip cell* de outro vaso por anastomose, formando a rede vascular. Figura extraída de: RAMJAUM, A.R.; HODIVALA-DILKE, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, p.523, 2009



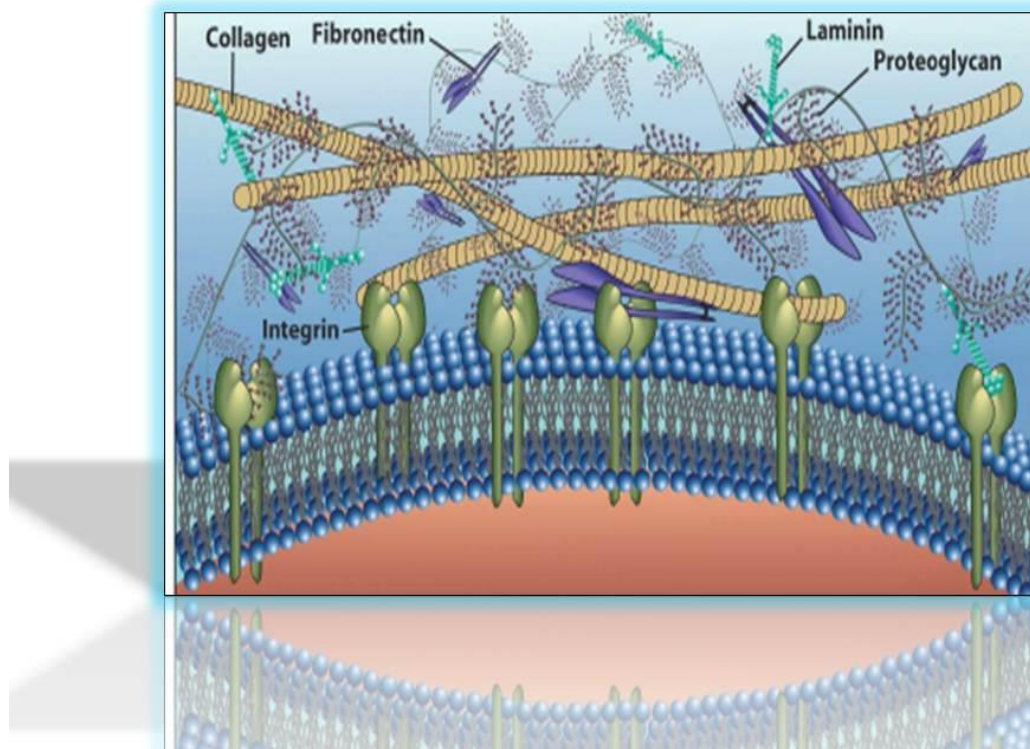
Interações célula-matriz determinam o destino final das células endoteliais durante a inflamação através dos receptores de adesão específicos, afetando a sinalização celular e o remodelamento vascular. “As Integrinas expressas em células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas dos vasos sanguíneos e nas plaquetas, permitem a comunicação e adesão com outras células e com a matriz extracelular, promovendo assim, uma série de eventos como a migração e o remodelamento vascular. (SANT’ANA *et al.*, 2008; RAMJAUN & HODIVALA-DILKE, 2009)”.

A matriz extracelular é formada principalmente por colágeno e fibronectina, e é fundamental para morfogênese vascular, participando de vários estágios importantes da angiogênese. Durante a fase de brotamento, por exemplo, a ligação das integrinas à matriz extracelular fornece suporte crítico para sinalização celular, proliferação, migração, sobrevivência e estabilização das células endoteliais; além, é claro, de sinalizar o citoesqueleto a dar início a morfogênese vascular (SENGER & DAVIS, 2011).

### 3.3 Matriz extracelular e integrinas

A matriz extracelular (MEC) é formada por diversas proteínas, e é um dos principais componentes do microambiente celular. Ela é capaz de exercer um controle preciso sobre todos os aspectos da angiogênese e a maturação dos vasos sanguíneos (SENGER & DAVIS, 2011). É uma estrutura altamente dinâmica, com várias funções, e é constantemente sujeita a processos de remodelação, onde, diversos componentes são degradados, depositados e remodelados. A dinâmica da MEC é indispensável em vários processos, como na proliferação celular, diferenciação e manutenção de nichos de células tronco, morfogênese e angiogênese, remodelação óssea e no reparo de feridas. Porém, se a matriz extracelular sofrer alterações, sérios problemas como proliferação desregulada de células, invasão, apoptose insuficiente dentre outros, podem resultar em defeitos congênitos, fibroses e câncer (LU *et al.*, 2011).

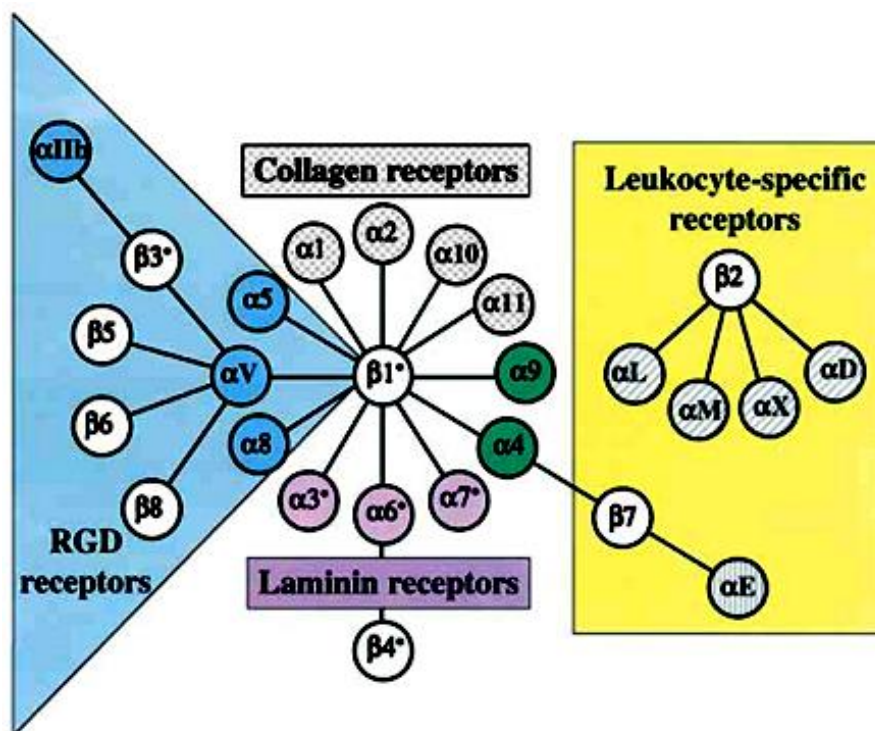
Os efeitos da MEC nas células são controlados principalmente por integrinas, as quais organizam as vias de sinalização e regulam a adesão aos componentes do citoesqueleto. As integrinas são glicoproteínas transmembranares compostas por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas não covalentemente, sendo que esta característica permite com que elas possam se ligar a diversas proteínas que formam a matriz extracelular, tais como o colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos, permitindo assim a adesão e comunicação celular com a matriz extracelular (ZHOU *et al.*, 2008) (Figura 5).



**Figura 5: matriz extracelular e seus principais componentes.** Moléculas de adesão celular, as integrinas são as principais proteínas de interação com a maioria das proteínas que compõem a matriz extracelular. MEC. Figura extraída de: <http://www.ht.org.ar/histologia/.com>

As integrinas são compostas por 18 subunidades  $\alpha$  e 8  $\beta$ , e podem formar no mínimo 24 heterodímeros diferentes (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010), suas subunidades são formadas a partir de vários domínios com ligantes flexíveis entre elas, e seus tamanhos variam, contendo de 750 a 1000 aminoácidos. Foram caracterizadas pela primeira vez em 1986 por Tamkun e colaboradores, e seu papel como alvo terapêutico já está bem estabelecido (CAMPBELL & HUMPHRIES, 2011). Cada heterodímero possui afinidades por diferentes motivos adesivos na MEC, e mesmo que a matriz extracelular possua diferentes proteínas, elas exigem sequências de reconhecimento semelhantes para se ligar às integrinas. Uma sequência de aminoácidos conhecida como motivo universal de reconhecimento celular é a sequência

RGD (Arg- Gly- Asp) presente em várias proteínas da matriz extracelular e tem como suas principais integrinas alvo:  $\alpha$ IIb,  $\alpha$ V,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 8,  $\beta$ 3,  $\beta$ 5,  $\beta$ 6 e  $\beta$ 8; outras sequências tais como a ECD (Glu-Cys-Asp) são receptores para colágeno e possuem as integrinas alvo  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 11 e  $\beta$ 1; a laminina tem como suas integrinas alvo  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7 e  $\beta$ 4, e também as integrinas  $\alpha$ L,  $\alpha$ M,  $\alpha$ X,  $\alpha$ D,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 7 que podem atuar como receptores específicos para os leucócitos (WOLFERSON, 2013; BARCZYK *et al.*, 2010) (Figura 6).



**Figura 6: Diagrama representando a variedade de integrinas.** São encontradas 18 subunidades  $\alpha$  e 8  $\beta$ , e elas podem se combinar de diferentes maneiras, podendo formar no mínimo 24 heterodímeros, com receptores RGD, conhecido como receptor universal podendo se ligar a diversas proteínas da matriz extracelular. Existem também os receptores para colágeno (ECD), para laminina e receptores específicos para leucócitos. Figura extraída de: HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors, integrins. v. 110, n. Table 1, p. 673–687, 2002.

Durante a resposta inflamatória, o processamento proteolítico dos componentes da matriz extracelular é determinado pela dinâmica natural das metaloproteinases de matriz

(MMPs) e outras proteases (DAVIS *et al.*, 2000). As MMPs formam um grupo específico de enzimas que possuem a habilidade de degradar diversos componentes da matriz extracelular (JUNIOR *et al.*, 2005). Sítios de reconhecimento para receptores de adesão nas células endoteliais podem ser expostos através das alterações moleculares da MEC como proteólise, forças mecânicas e novas interações conformacionais. Estes sítios denominados matricríticos podem ser encontrados em diferentes proteínas da MEC. É provável que os macrófagos contribuam significativamente para formação destes sítios através da produção de proteases capazes de expor esses sítios (DAVIS *et al.*, 2000, NEWBY, 2008). Importante sítio matricrítico, o RGD (Arg-Gly-Asp), presente na fibronectina e em outras proteínas da MEC, quando exposto pela proteólise, pode se ligar às integrinas  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$  promovendo processos de proliferação, migração, sobrevivência e interações célula-célula durante a angiogênese (RUOSLAHTI, 1996; RAMJAUN & HODIVALA-DILKE, 2009).

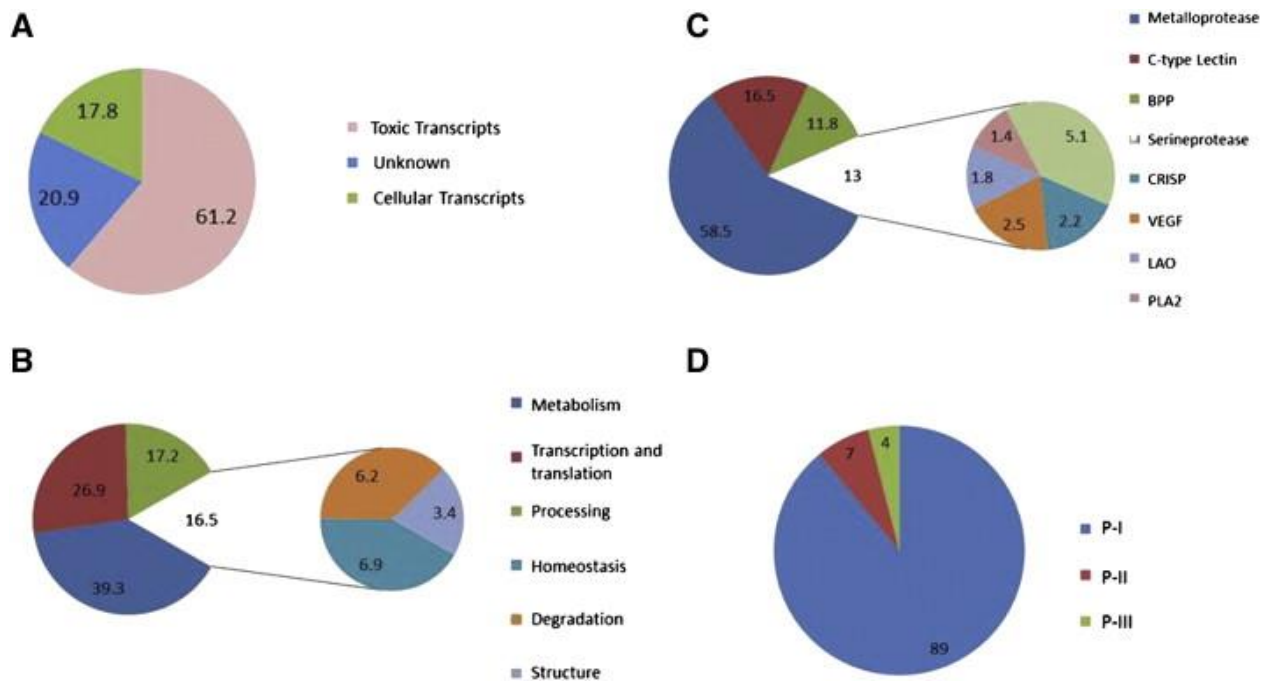
As MMPs podem também funcionar como reguladores angiogênicos positivos e negativos, por um lado favorecendo a migração das células endoteliais através das barreiras teciduais, e por outro lado, estudos recentes tem demonstrado que estas enzimas não são tão específicas em relação aos seus respectivos substratos. Um exemplo é que estas enzimas podem clivar moléculas de plasminogênio e colágeno tipo XVIII em angiostatina e endostatina, respectivamente, os quais são inibidores endógenos da angiogênese (ROY, *et al.* 2006).

Desordens caracterizadas pela vascularização exacerbada ou aberrante como o câncer e as inflamações crônicas podem ser controladas pelo uso de peptídeos solúveis que competem com a ligação de sítios matricríticos às integrinas (MEYER *et al.*, 2006).

#### **1.4 Alternagina-C (ALT-C) Desintegrina-like com domínio rico em cisteína e Veneno de serpentes.**

O Veneno de serpentes é uma substância composta por proteínas e polipeptídeos bioativos que são produzidos e armazenados em uma glândula altamente especializada. Após sua inoculação, o veneno age como toxinas agredindo parte do sistema fisiológico, podendo até levar a vítima à morte. Cerca de 90 a 95% do peso seco da peçonha é composta por proteínas e polipeptídeos (RUSSEL, 1980; TU, 1988) (Figura 7). Tanto na sua forma própria, como associados a outras proteínas, estes compostos classificados como enzimáticos e não enzimáticos, podem exercer uma série de efeitos farmacológicos (DOLEY & KINI, 2009). É possível encontrar no veneno de serpentes diferentes tipos de proteínas que atingem a cascata de coagulação, o sistema hemostático e também os processos de reparo tecidual. As metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMPs) formam uma complexa família de proteínas altamente conservadas e encontradas na maioria das serpentes venenosas (TAKEDA *et al.*, 2012) (Figura 7).

As metaloproteinases de veneno de cobra (SVMPs) podem ser classificadas em PI, PIIa e PIIb, PIIIa e PIIIb, e PV. O critério para a classificação é baseado na presença ou ausência de domínios observados através de mRNA de proteínas do veneno isoladas. Basicamente, a classe PI envolve a classe mais simples, contendo apenas um domínio metaloproteinase, a classe PII possui dois domínios, um domínio metaloproteinase e um domínio desintegrina, e a classe PIII, possuindo 3 domínios: metaloproteinase, rico em cisteína e domínio desintegrina, e a classe PV possui um domínio Lectina-like (FOX & SERRANO., 2008; DE PAULA *et al.*, 2014). Capazes de interromper interações célula-matriz, as desintegrinas podem também ser encontradas nestas peçonhas e muitas delas, podendo apresentar sequências tais como a RGD (Arg-Gly-Asp), e a ECD (Ácido Glutâmico-Cisteína-Ácido Aspártico) ou mesmo uma sequência semelhante, com alta habilidade em bloquear as integrinas e seus ligantes (KAMIGUTI *et al.*, 1991; CALVETE, *et al.*, 2005). As desintegrinas começaram a ser estudadas há 25 anos, e a partir daí novos estudos foram possíveis, levando a descoberta de novas classes de proteínas (CALVETE, *et al.*, 2013).



**Figura 7: Composição do veneno da *Bothrops alternatus* de acordo com a família de proteínas expressas em porcentagem em relação ao teor de proteínas total.** A) o veneno é composto por 20,9% de proteínas hipotéticas ou desconhecidas, 17,8% de substâncias relacionadas a processos e funções celulares, e 61,2% de transcritos que codificam para compostos tóxicos. B) transcrições relacionadas a funções e processos celulares I) metabolismo (relacionados a anabolismo e catabolismo de nutrientes). II) relacionados a transcrição e tradução, tais como fatores de ligação e enzimas. III) relacionados com as modificações pós-traducionais. V) relacionados com a degradação de polipeptídeos. IV) funções estruturais. C) codificação tóxica dividida em 8 subcategorias: metaloproteases (58,5%), lectinas do tipo C (16,5%), proteínas de serina (5,1%), BBP (bradicinina potencializando peptídeos) (11,8%), Cys rico em proteínas secretoras (2,2%), VEGF (2,5%), LAO (L-aminoácido oxidase) (1,8%) e fosfolipases A2 (1,4%). D) os três grupos principais de classe de SMVP de serpentes, sendo que a classe PIII compreende a maior delas, com 3 domínio: metaloproteínase, cisteína e desintegrina. Figura extraída de: FOX, Jay W.; SERRANO, Solange MT. 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, n. 12, p. 3016-3030, 2008

Tanto o veneno quanto o isolamento de seus componentes têm sido bastante estudado e aplicado em diversos trabalhos científicos. Dentre eles a Alternagina-C ALT-C (29kDa), isolada e caracterizada por Souza e colaboradores (2000) no laboratório de biologia molecular e bioquímica da Universidade Federal de São Carlos UFScar. Obtidos através do veneno da serpente *Bothrops alternatus* estas metaloproteinases, pertencem a classe PIII, e podem inibir a adesão mediada pelo colágeno tipo I de células transfectadas K562 –  $\alpha 2\beta 1$ , sendo essa inibição de maneira dose dependente (SOUZA *et al.*, 2000)

A ALT-C é purificada através de duas passagens no gel de filtragem, seguido por cromatografia de troca iônica, e sua sequência parcial de aminoácidos confirmam que a ALT-C possui homologia como uma desintegrina-like com motivo ECD, e não se liga as integrinas  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$   $\alpha_1\beta_1$   $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_9\beta_1$ , podendo sugerir uma especificidade às integrinas  $\alpha 2\beta 1$  (SOUZA, *et al.*, 2000) . As metaloproteinases da classe P-III, como a ALT-C, por exemplo, apresentam domínio tipo desintegrina e outro domínio com cisteína adicionado ao seu C-terminal (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010; BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994) (Figura 8).



Disintegrin	Structure	Adhesive motif	Preferred integrin	Cognate ligand	Relevant inhibitory activity (conc.*)
salmosin 2	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (5 $\mu\text{g}$ )
saxatilin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis (100 nM)
jarastatin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_{3M}\beta_2$	Vn, Fn, ICAM-1	melanoma lung metastasis ** (1 $\mu\text{M}$ )
flavolidin	monomeric medium	RGD	$\alpha_5\beta_1$	Fn	melanoma lung metastasis ** (1 $\mu\text{M}$ )
kistrin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma lung metastasis ** (1 $\mu\text{M}$ )
colombistatin	monomeric medium	RGD	nd	Fn	tumor cell migration (IC50 = 1.8 $\mu\text{M}$ )
trigramin	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	bone metastasis ** (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
DisBa-01	monomeric medium	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	melanoma metastasis ** (2 mg/Kg)
eristostatin	monomeric short	RGD	$\alpha_{2b}\beta_3$	Fg	melanoma metastasis (25 $\mu\text{g}$ )
echistatin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	osteoclast migration (10 nM)
triflavin	monomeric short	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (0.1–0.4 $\mu\text{M}$ )
contortrostatin	Homodimeric	RGD	$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$	Fn	tumor angiogenesis ** (60 $\mu\text{g}/\text{day}$ )
alternagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_2\beta_1$	collagen I	angiogenesis ** (1 $\mu\text{M}$ )
leberagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$	Vn, Fn	melanoma cell adhesion (100 nM)
acurhagin-C	monomeric D/C	ECD	$\alpha_v\beta_3$	Vn	angiogenesis ** (0.4 $\mu\text{M}$ )
VLO5	heterodimeric	VGD, MLD	$\alpha_9\beta_1$	TN, VCAM	glioblastoma growth (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
obtustatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis ** (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
viperistatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	melanoma cell transmigration (1–4 $\mu\text{M}$ )
lebestatin	monomeric short	KTS	$\alpha_1\beta_1$	collagen IV	angiogenesis ** (0.1–0.5 $\mu\text{g}/\text{embryo}$ )

**Figura 8: Efeitos das desintegrinas, seu motivo adesivo e integrinas alvo.** As desintegrinas possuem diferentes alvos, motivo adesivo e integrinas alvo específicas. A ALT-C, por exemplo, tem motivo adesivo ECD, integrina alvo  $\alpha_2\beta_1$  e uma relevante atividade inibitória na angiogênese. Figura extraída do artigo: SELISTRE-DE-ARAUJO, HS et al. Snake Venom Desintegrin and Cell Migration. *Toxins*. p.2606-2621, 2010.

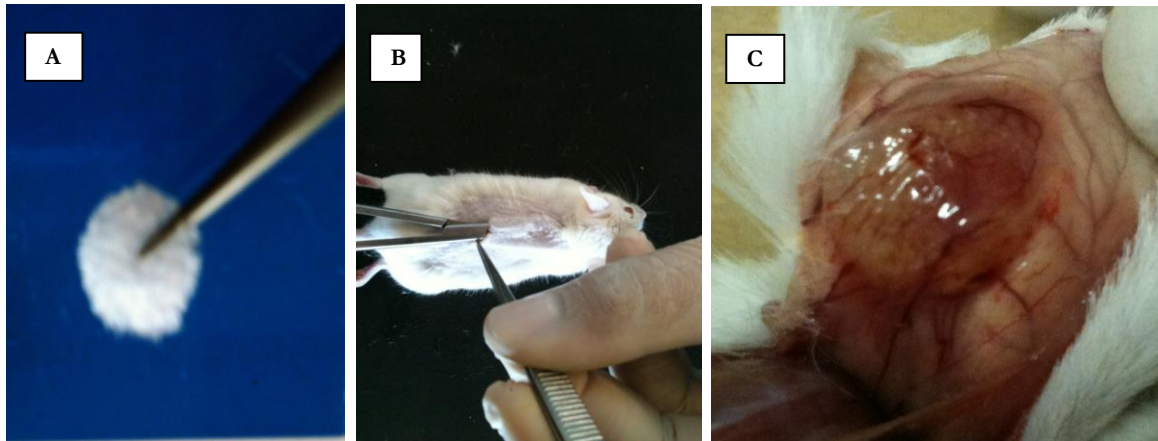
## 1.5 Implantes sintéticos (modelo experimental).

Diversos modelos experimentais que permitem avaliar componentes inflamatórios e angiogênicos de forma concomitante demonstram uma importante ferramenta na descoberta e avaliação de muitas terapias, podendo atenuar ou até mesmo inibir processos patológicos. Modelos de implantação subcutânea de matrizes esponjosas (poliéster poliuretano) em roedores têm possibilitado o estudo da inflamação, angiogênese e reparação tecidual (CASSINI *et al.*, 2014, ARAUJO *et al.*, 2010 e 2013, MENDES, *et al.*, 2009, ROCHA, *et al.*, 2006, ANDRADE *et al.*, 1997). Este modelo de matriz esponjosa e implantação subcutânea foi inicialmente descrito por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade e colaboradores em 1987.

A indução de uma reação inflamatória tipo corpo estranho após a implantação da matriz esponjosa, tem como resposta a formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, neovascularização e matriz extracelular, envolvidos por um tecido fibroso em forma de capsula (CASSINI *et al.*, 2014, ARAUJO *et al.*, 2010 e 2013, MENDES, *et al.*, 2009, ROCHA, *et al.*, 2006, ANDRADE *et al.*, 1997).

Modelo de implantes sintéticos tem possibilitado o estudo e a avaliação de diversos processos associados à angiogênese inflamatória, inflamação aguda e crônica, por apresentarem facilidade na reprodução dos mesmos, e possibilitam também, a investigação de características morfofuncionais em condições normais e patológicas (CASSINI *et al.*, 2014, ARAUJO *et al.*, 2010 e 2013, BARCELOS, 2009; SARASWATI, 2013) (Figura 9).

Desse modo, investigar os efeitos da desintegrina-like ATL-C, na angiogênese inflamatória induzida por implantes de matriz esponjosa subcutâneos, pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento de doenças inflamatórias crônicas.



**Figura 9: modelo experimental de implantes sintéticos subcutâneos em camundongos (atual).** A) esponja (matriz sintética) de 8mm de poliéster- poliuretano. B) implante subcutâneo da matriz sintética na região interescapular no camundongo. C) remoção para análise da esponja após 9 dias de tratamento com a desintegrina-like ALT-C.

## **2-OBJETIVO GERAL**

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

### **2.1 – Objetivos específicos:**

- Avaliar através de parâmetros bioquímicos o efeito desta desintegrina-like nos processos inflamatório e angiogênico do tecido fibrovascular;
- Determinar a influência deste composto na produção de citocinas pró-angiogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, FGF, KC e MCP-1);
- Avaliar histologicamente a influência deste composto nos componentes celulares do tecido fibrovascular induzido pelos implantes de esponjas.

### **3– MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Obtenção do veneno das serpentes *B. alternatus***

A alternagina-C (ALT-C), foi isolada do veneno da serpente *Bothrops alternatus* doado pelo Instituto Butantan de São Paulo, SP. Os processos de purificação desta proteína e isolamento foram realizados no laboratório de bioquímica da UFScar (Universidade Federal de São Carlos) e posteriormente padronizados por (SOUZA *et al.*, 2000) e dependeram previamente de duas purificações em coluna de gel filtração Superdex-200 (GE Healthcare 16/60). Em seguida a amostra foi processada em cromatografia de troca iônica MonoQ 5/50GL (GE Healthcare).

#### **3.2 - Animais**

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

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a ética em pesquisa animal, sendo esse trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, processo número 157/13.

#### **3.3 – Técnica de implantação**

Discos de esponjas (poliéster poliuretano) de 8 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram mantidos em álcool 70% v/v durante pelo menos, 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos. Estes implantes foram utilizados para induzir a inflamação, angiogênese e fibrose subcutânea (CASSINI *et al.*, 2014, ARAÚJO *et al.*, 2010 e 2013, ANDRADE *et al.*, 1987).

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

### **3.4 – Regime de tratamento com a ALT-C**

Os animais foram divididos em quatro grupos de oito animais cada, total de 32 animais: um grupo controle (salina) e três grupos tratados com ALT-C (10 ng, 100 ng e 1000 ng em 10 µL de solução salina). Os animais receberam o tratamento intra-implante logo após a implantação cirúrgica, durante todos os dias, no mesmo horário até o 8º dia pós-implantação.

### **3.5 - Remoção das implantes**

No 9º dia pós-implantação os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com tiopental 100 mg/kg via intraperitoneal. Após eutanásia, os discos de esponja foram retirados através de incisão mediana na região dorsal, em seguida, dissecados, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

### **3.6 – Avaliação do infiltrado tecidual**

O modelo de implantes de esponja induz a formação de um infiltrado tecidual rico em células inflamatórias, vasos neo-formados e matriz extracelular. Sendo assim, é esperado que, quanto mais tecido infiltrado para o implante, maior o peso do mesmo, e vice-versa. Portanto, utilizamos o peso dos implantes para determinar o infiltrado tecidual nos mesmos.

### **3.7 - Dosagem de hemoglobina (avaliação indireta da neovascularização)**

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

As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina (etapa inicial das dosagens bioquímicas), o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de citocinas. A esponja dividida e pesada para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

### **3.8 - Avaliação da atividade de MPO (neutrófilos)**

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

Após o congelamento, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado em microtubos (ependorf) de 1,5mL e a reação seguiu a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%; 100µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); adicionou-se 200µL do sobrenadante da amostra deixou reagir por 1 minuto cronometrado. Para interromper a reação, adicionou-se 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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).

### **3.9 - Avaliação da atividade de NAG**

A n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativadas. Essa enzima foi utilizada como um índice da atividade destas células nos sítios inflamatórios através da técnica de Bailey, (1988).

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

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

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



### 3.10- Dosagem de citocinas e quimiocinas

Foram dosadas citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , VEGF, FGF e TGF $\beta$ -1) e as quimiocinas (CXCL-1 e CCL-2/JE/MCP-1). Para a avaliação das citocinas utilizou-se a reação imunoenzimática de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi congelado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  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, pH 7,4. Posteriormente, foi adicionado na placa, o tampão de bloqueio (5% BSA em PBS, pH 7,4), seguido de incubação por 1 hora.

Após nova etapa de lavagem, foram adicionados à placa,  $100\mu\text{L}$ /poço dos padrões (15-1000 pg/mL) 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 v/v), pH 5,0. Em seguida, as placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos.

A reação foi interrompida com a adição de  $50\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M e as placas analisadas em O.D. 540nm. Todos os passos de incubação (exceto aqueles overnight) foram feitos a temperatura ambiente. A concentração da citocina de cada implante foi calculada a partir de uma curva padrão e os resultados expressos em concentração de proteína (pg/mL) por implante.

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

### 3.11 - Avaliação da deposição de colágeno solúvel

A deposição de colágeno foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total foi quantificada colorimetricamente baseada na reação do Picrossirius Red. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006).

Sucintamente, as amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100) depois da homogeneização, os debris foram removidos pela centrifugação. Foram adicionados 50µL do reagente picrossirius red em 50µL da amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrossirius red foi separado por centrifugação a 10,000 g durante 15 minutos, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1ml de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante.

### 3.12 - Análise histológica das matrizes esponjosas

Realizou-se um novo experimento, seguindo o mesmo regime terapêutico. Após a retirada dos implantes, os implantes foram cuidadosamente fixados em solução de methacarn. Os implantes foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo (secções de 5 µm) e as lâminas foram coradas com:

- 1) Tricrômico de Gomori, para visualização do infiltrado tecidual e quantificação de vasos. *Os cortes foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X).* microscópio LEICA ICC50.
- 2) Picrossirius red para avaliação da deposição de colágeno. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico sob luz polarizada e registrados fotograficamente (objetiva de 10X, ocular de 10X) microscópio Nikon TS 100.
- 3) Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico utilizando a objetiva de (40X e ocular de 10X) microscópio LEICA ICC50.

Cada corte teve o registro fotográfico na área total de tecido fibrovascular formado no implante, exceto na região central onde houve as injeções de tratamento. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Histologia (UFU).

### **3.13 – Análises estatísticas**

Os resultados foram apresentados pelas médias  $\pm$  d.p.m. dos dados. A comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se o teste *t* de Student, quando os dados consistiram de mais de dois grupos foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-keuls. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0.05$ . Para realização da análise e construção de gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.

## 4 - RESULTADOS

Durante os 9 dias de experimento, observou-se que tanto a cirurgia quanto a matriz sintética implantada e também o tratamento, foram bem tolerados pelos animais uma vez que não houve alteração de comportamento, não foram observados sinais de infecção ou rejeição dos implantes pelos animais, nem sinais de toxicidade como apatia nem perda de peso.

### 4.1 – Efeito da ALT-C sobre o infiltrado tecidual no implante de esponja

O tratamento com a dose de 1000 ng aumentou significativamente o peso do implante (mg) quando comparado ao grupo controle:  $57,9 \pm 8,48$  (controle) versus  $58,75 \pm 13,81$  (10ng),  $65,81 \pm 14,13$  (100ng) e  $85,48 \pm 22,68$  (1000ng) (gráfico 1).

### 4.2 – Efeito da ALT-C na inflamação

#### **A ALT-C inibiu componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzido pelos implantes subcutâneos nos camundongos.**

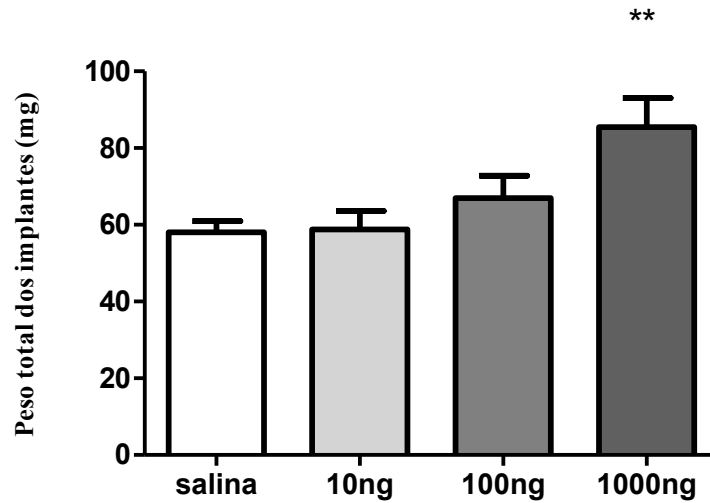
A inflamação foi avaliada pelo infiltrado de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, além de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é considerada um dos principais mediadores da inflamação. O tratamento com a ALT-C levou a uma redução significativa dessa citocina, de forma dose dependente nas três doses avaliadas quando comparadas ao grupo controle:  $6,25 \pm 3,01$  (controle) versus  $3,07 \pm 1,05$  (10ng),  $2,43 \pm 0,97$  (100ng),  $2,03 \pm 2,15$  (1000ng) (gráfico 2).

Os neutrófilos representam as principais células da fase aguda da inflamação. Em nosso trabalho, com as doses avaliadas, não houve diferença significativa do tratamento com a ALT-C em relação ao controle, ao avaliarmos sua atividade através da enzima MPO (gráfico 3). Foi avaliado também, através do ensaio de ELISA, a principal quimiocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos, a CXCL-1/KC. O tratamento com a desintegrina-like ALT-C reduziu significativamente essa quimiocina na dose de 1000ng quando comparada ao controle:  $4,58 \pm 0,80$  (controle) versus  $3,17 \pm 1,10$  (1000ng) (gráfico 4).

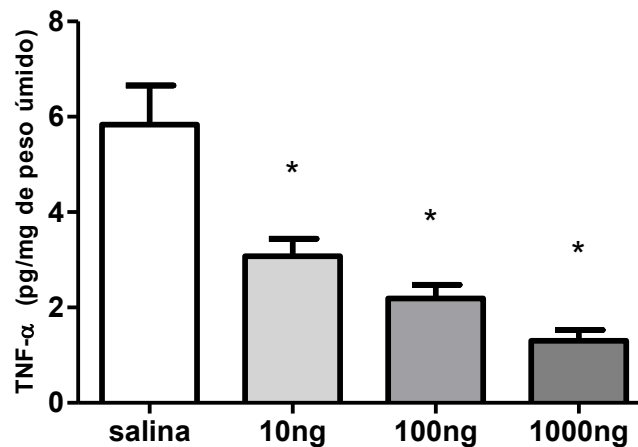
A principal célula da inflamação crônica é, sem dúvidas, o macrófago. O conteúdo de macrófagos foi avaliado indiretamente através da atividade da enzima NAG. Nossos resultados

mostram que o tratamento com a ALT-C diminuiu significativamente o infiltrado de macrófagos, apresentando redução em todas as doses avaliadas 4,13±2,31 (controle) versus 2,16±1,16 (10ng), 2,51±1,25 (100ng) e 1,97±1,11 (1000ng) (gráfico 5). A quimiocina CCL2/JE/MCP-1, responsável no recrutamento de macrófagos, também foi inibida, de forma dose dependente, nas 3 dosagens 8,77±1,5 (controle) versus 6,31±1,5 (10ng), 5,69±0,93 (100ng) e 4,61±0,75 (1000ng) (gráfico 6).

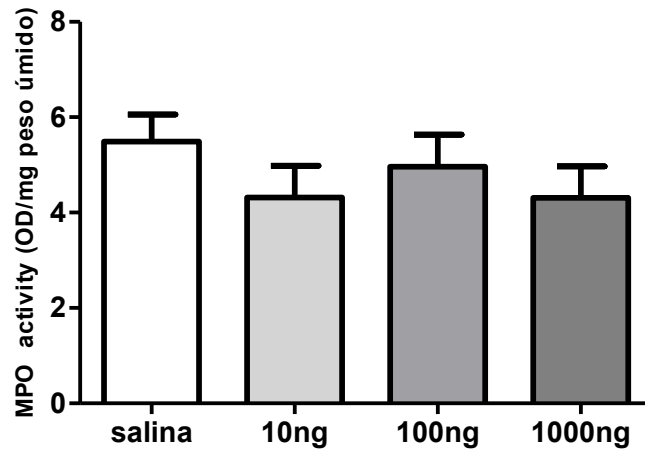
Os mastócitos são células importantes praticamente em todas as etapas da resposta inflamatória. A quantificação de mastócitos nos cortes histológicos por AT (azul de toluidina) mostraram que o tratamento com a ALT-C reduziu significativamente o conteúdo dessas células no tecido fibrovascular induzido por implantes em todas as doses avaliadas comparadas ao controle, 36,2±9,03 (controle) versus 17,6±11,12 (10ng), 12,8±6,68 (100ng) e 8,4±3,50 (1000ng) (gráfico 7).



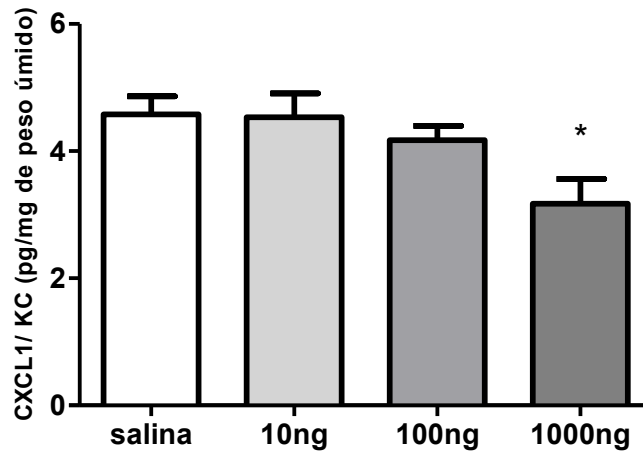
**Gráfico 1: Efeito da ALT-C no peso úmido dos implantes sintéticos subcutâneos em camundongos.** Houve um aumento significativo no peso úmido dos implantes na maior dose administrada. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*\* $p < 0,01$ .



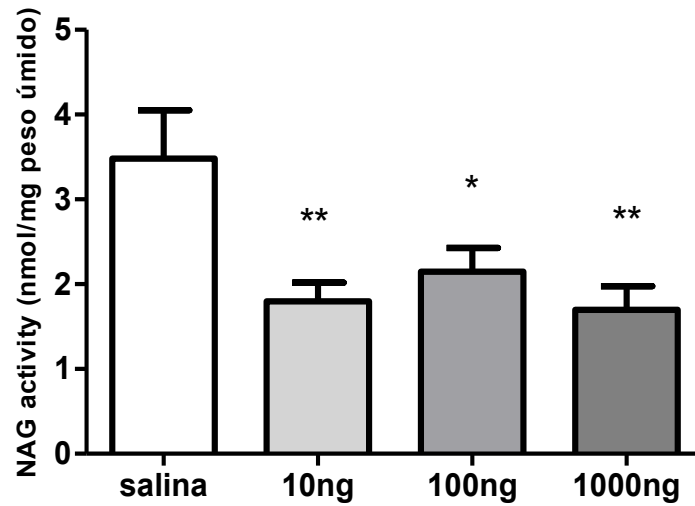
**Gráfico 2: Efeitos na concentração de TNF- $\alpha$  nos implantes tratados com a ALT-C.** Os tratamentos com a ALT-C mostrou diferenças significativas nas três doses, 10ng, 100ng e 1000ng de forma dose dependente. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \* $p < 0.05$ .



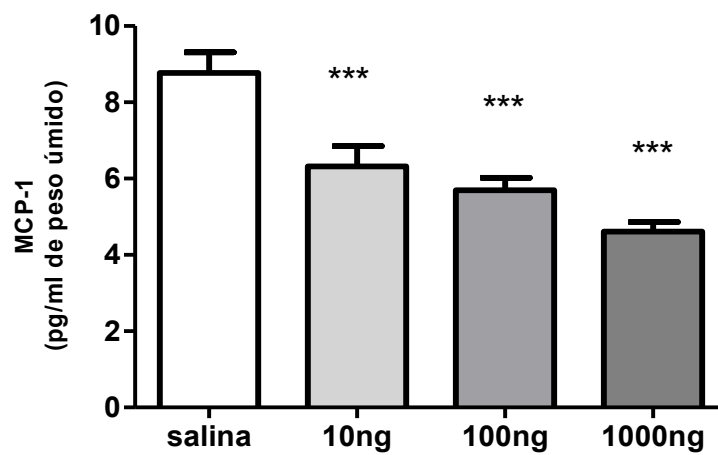
**Gráfico 3: Efeito da ALT-C na atividade de MPO.** Não houve diferença na atividade de MPO nos grupos tratados com ALT-C. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais.



**Gráfico 4: Efeito da ALT-C na concentração da quimiocina CXCL1/KC.** Apenas a dose de 1000ng houve redução na concentração de CXCL1/KC. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \* $p < 0.05$ .

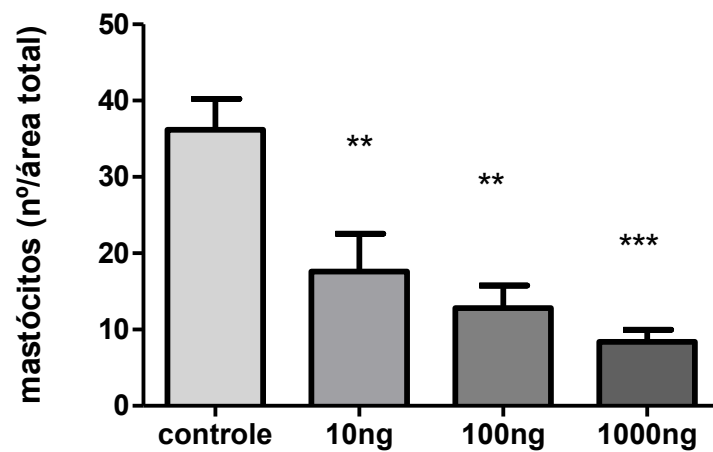


**Gráfico 5:** Efeitos da ALT-C na atividade enzimática (NAG) N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase. NAG mostrou diferenças reduzindo sua atividade nas doses de 10ng, 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$



**Gráfico 6:** Efeitos da ALT-C na concentração de CCL-2/JE/MCP-1. Diferenças foram mostradas nas três dosagens de forma dose dependente, 10ng, 100ng e 1000ng. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*\*\* $p < 0.001$ .





**Gráfico 7: Efeitos na quantidade de mastócitos nos implantes subcutâneos.** Os tratamentos com a ALT-C diminuiu o número de mastócitos em todas as doses administradas em relação ao controle (10ng, 100ng e 1000ng). Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 4.3 – Efeitos da ALT-C na angiogênese

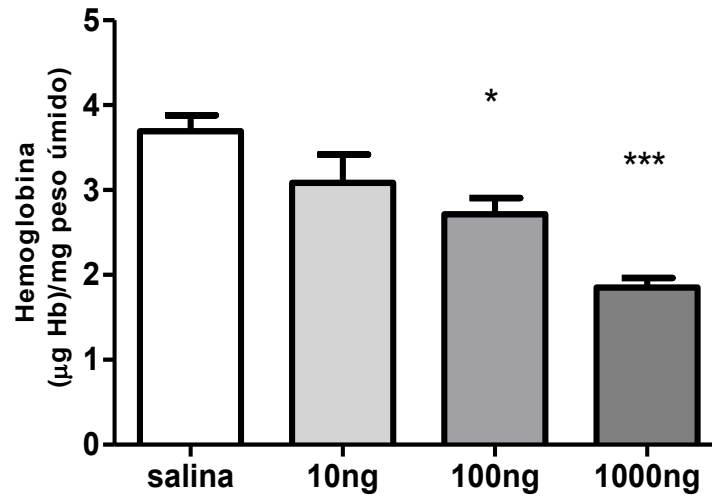
#### **A ALT-C inibiu a angiogênese do tecido fibrovascular induzido por implantes subcutâneos**

A angiogênese foi avaliada indiretamente pela dosagem do conteúdo de hemoglobina nos implantes e, diretamente pela contagem de vasos sanguíneos nos cortes histológicos. Além disso, citocinas caracteristicamente pró-angiogênicas como VEGF e FGF foram avaliadas.

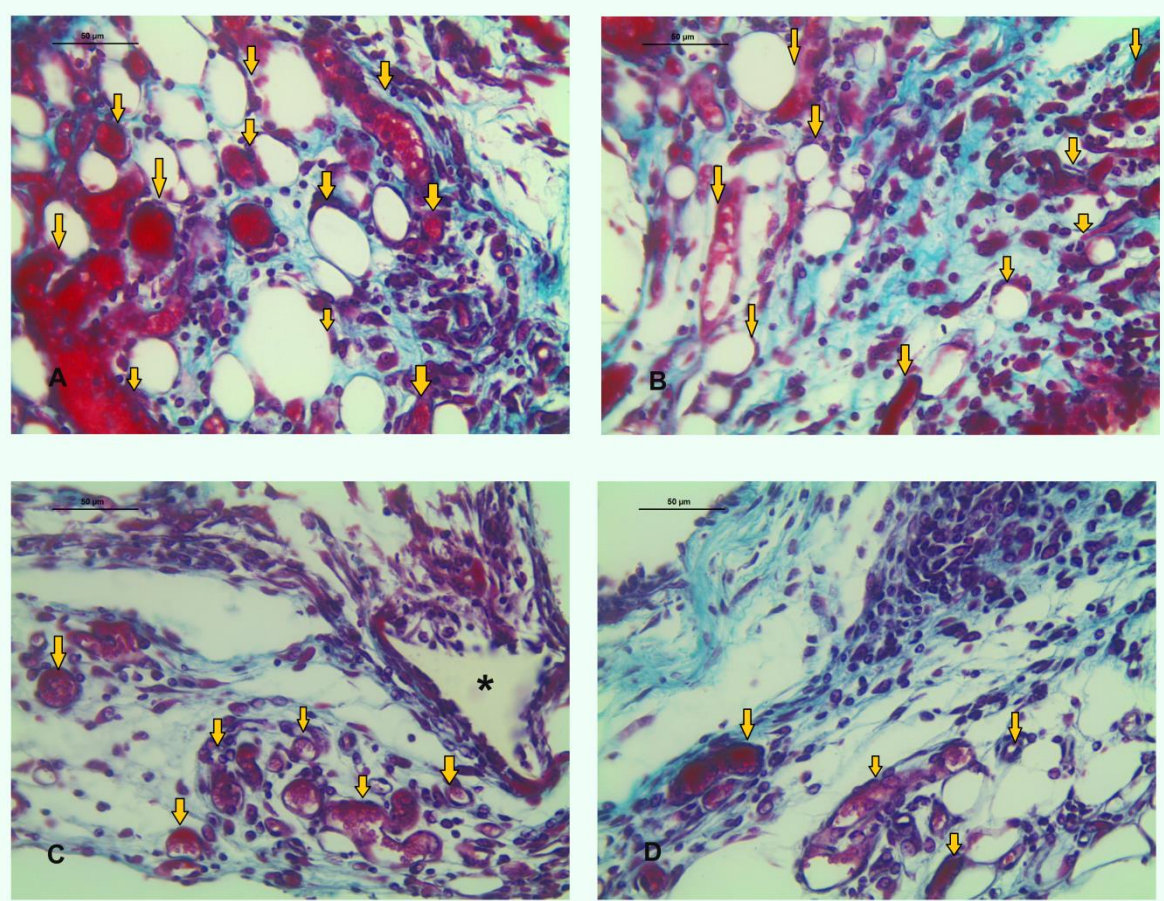
O tratamento com ALT-C reduziu significativamente o conteúdo de hemoglobina nas doses de 100ng e 1000ng, quando comparadas ao controle podendo significar uma diminuição na formação de neovasos crescimento dos vasos:  $3,69 \pm 0,49$  (controle) versus  $3,08 \pm 0,88$  (10ng);  $2,71 \pm 0,46$  (100ng) e  $1,85 \pm 0,32$  (1000ng) (gráfico 8).

Essa redução da angiogênese através da dosagem de hemoglobina corrobora o resultado encontrado da quantificação dos vasos nos cortes histológicos a qual revelou uma diminuição nas três doses administradas:  $224,4 \pm 46,85$ /área total (controle) versus  $134,20 \pm 34,12$ /área total (10ng);  $98,60 \pm 25,12$ /área total (100ng) e  $72,80 \pm 32,46$ /área total (1000ng) (gráfico 9, figura 10).

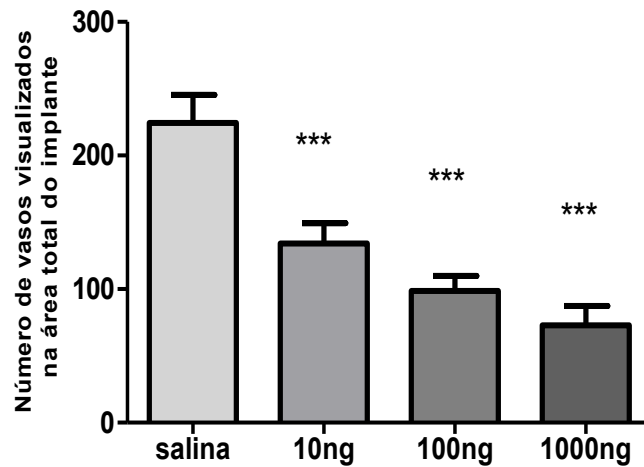
A análise das citocinas pró-angiogênicas VEGF e FGF também confirmam os resultados anteriores, uma vez que houve diminuição das duas citocinas. O VEGF diminuiu nas doses de 100ng e 1000ng comparando com o controle:  $8,64 \pm 3,26$  (controle) versus  $13,23 \pm 3,75$  (10ng);  $4,59 \pm 2,03$  (100ng) e  $3,71 \pm 1,39$  (1000ng) (gráfico 10). Enquanto que, o FGF mostrou uma diminuição significativa, de forma dose dependente, nas três doses:  $26,01 \pm 6,71$  (controle) versus  $12,96 \pm 4,06$  (10ng);  $9,42 \pm 3,10$  (100ng) e  $5,46 \pm 3,01$  (1000ng) (gráfico 11).



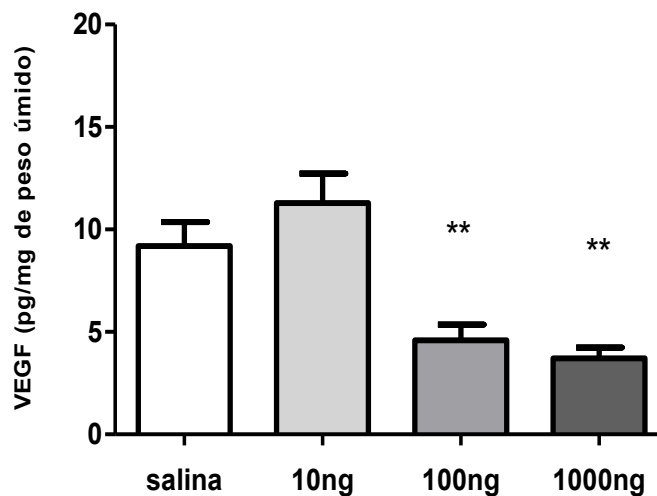
**Gráfico 8: Efeito no tratamento com ALT-C na concentração de hemoglobina:** A neovascularização na matriz sintética implantada diminuiu o conteúdo de hemoglobina nos grupos tratados com ALT-C em relação ao controle salina. Valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



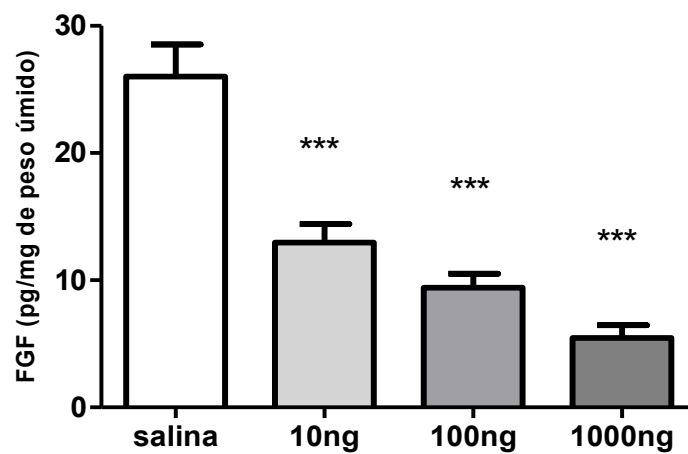
**Figura 10: Cortes histológicos (5µm, coloração tricrômico de gomori).** Infiltrado de tecido fibrovascular na matriz esponjosa dos implantes sintéticos subcutâneos nos camundongos, formado principalmente de vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos. Em (A) nota-se maior quantidade de vasos (setas) e maior diâmetro comparado com os grupos tratados com ALT-C nas doses de 10ng (B), 100ng (C) e 1000ng (D). \* representa matriz sintética – Barra - 50µm. *n* = 5 animais para cada grupo.



**Gráfico 9:** Número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos. O número de vasos diminuiu significativamente em todas as três doses (10, 100 e 1000ng) em relação ao controle, comportamento tipo dose dependente. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais \*  $p < 0,05$ .



**Gráfico 10:** Efeito da ALT-C na concentração de VEGF nos implantes. A ALT-C diminuiu significativamente a concentração de VEGF nas dosagens de 100ng e 1000ng, Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$



**Gráfico 11: Efeito do tratamento com ALT-C na concentração de FGF.** A concentração de FGF mostrou-se significativamente menor nas dosagens de 10, 100 e 1000ng. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*\*\*  $p < 0,001$ .

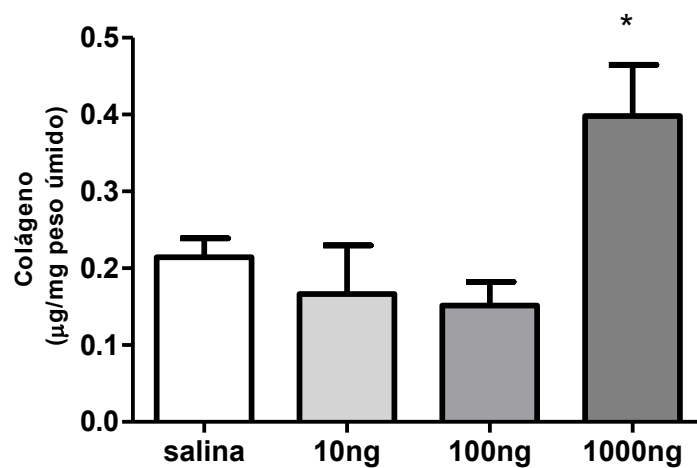
#### **4.4 – Efeitos da ALT-C sobre a deposição de colágeno**

##### **A ALT-C aumentou a deposição de colágeno no tecido fibrovascular**

O colágeno é o principal constituinte da matriz extracelular sendo, portanto, importante para a fase final da inflamação que envolve o reparo tecidual. A deposição de colágeno no tecido fibrovascular induzido por implantes foi avaliada pela dosagem bioquímica do colágeno solúvel e pela técnica histológica de coloração por picrossírius red seguida de análise por luz polarizada além da dosagem por ELISA da citocina TGF- $\beta$ 1.

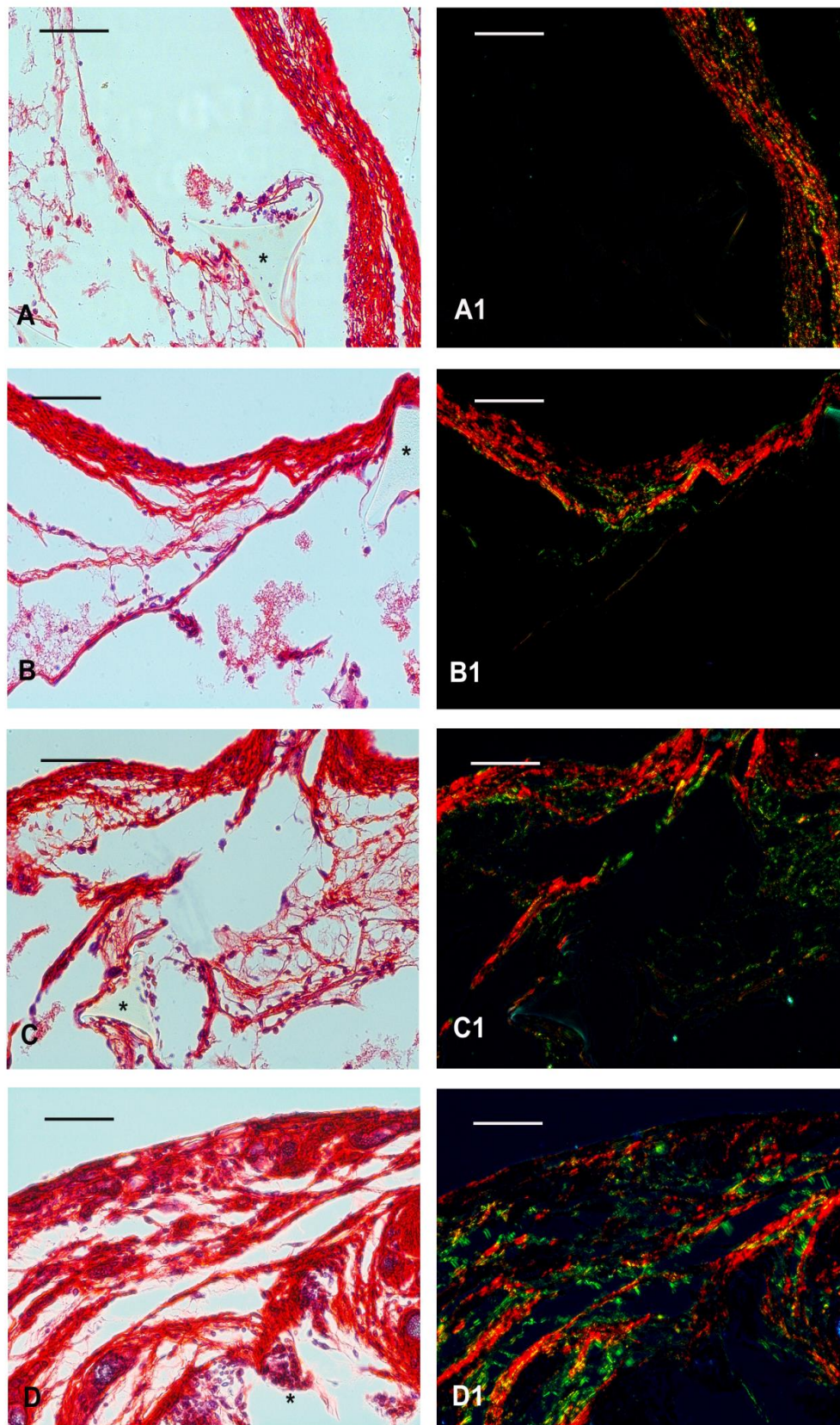
A ALT-C induziu a deposição de colágeno na dose de 1000ng nas duas técnicas avaliadas.  $0,21 \pm 0,06$  (controle) versus  $0,16 \pm 0,16$  (10ng),  $0,15 \pm 0,08$  (100ng),  $0,43 \pm 0,17$  (1000 ng) (gráfico 12) para colágeno solúvel e  $6,8 \pm 1,3$  (controle) versus  $6,99 \pm 1,95$ (10ng)  $6,04 \pm 2,57$  (100ng)  $11,09 \pm 3,12$  (1000ng) (gráfico 13 e figura 11) para colágeno total.

Esses dados são corroborados pela análise da principal citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1, a qual o tratamento com a ALT-C também promoveu aumento significativo desta na dose de 1000ng comparada ao controle:  $16,02 \pm 8,74$  (controle) versus  $18,62 \pm 8,89$  (10ng),  $20,92 \pm 7,54$  (100ng) e  $30,14 \pm 9,19$  (1000ng) (gráfico 14).



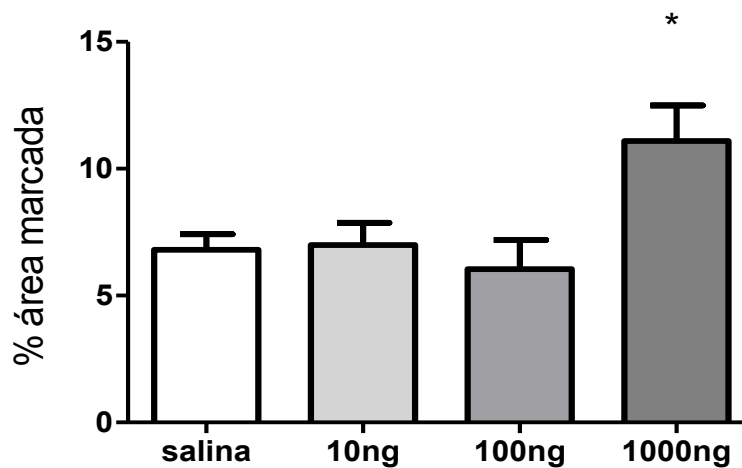
**Gráfico 12: Efeito da ALT-C na concentração de colágenos solúvel nos implantes subcutâneos.** Apenas a dose de 1000ng mostrou diferença significativa em relação as outras doses. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*  $p < 0,05$ .



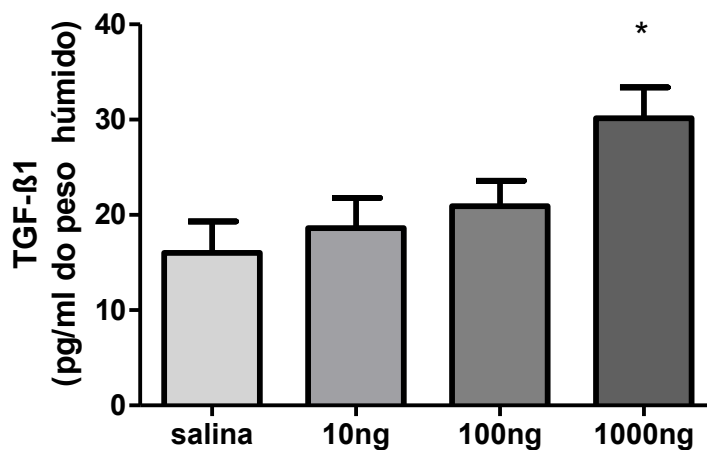


**Figura 11:** Cortes histológicos (5µm, coloração picrosirius, microscopia de polarização). Deposição de colágeno total no infiltrado de tecido fibrovascular nos implantes subcutâneos nos camundongos. A) grupo salina picrosirius e A2) mesma

foto com polarização. B) 10ng, B1) polarização. C) 100ng, C1) polarização e D) 1000ng, D1) polarização. Houve maior deposição de colágeno no na dose de 1000ng (D). Barra - 100 $\mu$ m.  $n = 5$  animais para cada grupo.



**Gráfico 13: Efeitos da ALT-C na deposição de colágeno total (polarização) nos implantes subcutâneos.** Os animais tratados com a dose de 1000ng induziu um aumento na deposição de colágeno e diferença significativa em relação ao controle e doses de 10 e 100ng . Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 5 animais. \*  $p < 0,05$ .



**Gráfico 14: Efeitos da ALT-C na concentração de TGF-β nos implantes subcutâneos.** Os implantes tratados com ALT-C apresentou aumento na concentração de TGF-β apenas na dose de 1000ng. Os valores representam as médias (d.p.m) dos grupos de 8 animais. \*  $p < 0,05$ .

## 5 – DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da desintegrina-like ALT-C na inflamação crônica induzida por implantes sintéticos em camundongos. Este modelo experimental murino, o qual induz uma inflamação crônica tipo corpo estranho, estimula a formação de tecido fibrovascular e a infiltração de componentes chaves da inflamação, angiogênese e reparo tecidual; possibilitando testar diversos compostos e toxinas com supostos potenciais terapêuticos (CASSINI *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2010 e 2013; BARCELOS *et al.*, 2009).

As integrinas, enfoque do nosso estudo, são importantes proteínas transmembranares que atuam na manutenção da integridade tecidual e transdução de sinais. Elas podem sofrer rearranjos conformacionais complexos, regulando interações com proteínas da matriz extracelular e associações com o citoesqueleto. Elas podem ser inibidas, bloqueadas ou moduladas pelas desintegrinas, que são polipeptídeos extraídos do veneno de serpentes (CALVETE, 2013; WEGENER & CAMPBELL 2008; CAMPBELL & HUMPHRIES 2010; COMINETTI 2004).

Souza e colaboradores (2000), demonstraram em suas pesquisas que a desintegrina ALT-C se liga seletivamente a integrina  $\alpha 2\beta 1$ , ativando vias de sinalização intracelular e induzindo a expressão gênica. Durante a inflamação e no reparo tecidual, as integrinas interagem com uma grande variedade de proteínas, tais como, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas; e promove a adesão celular, permitindo migração e proliferação das células na região inflamada. Algumas integrinas podem ativar fatores de crescimento latentes como TGF- $\beta$ , modulando a inflamação e a formação do tecido de granulação (KOIVISTO *et al.*, 2014). As integrinas que possuem subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  e  $\alpha 11$  combinam com a subunidade  $\beta 1$ , e podem se ligar a vários tipos de colágeno, principalmente ao colágeno tipo I, sendo este o mais abundante colágeno da matriz extracelular. As integrinas são moléculas bidirecionais, mediando sinalizações do meio extracelular para dentro da célula e do interior da célula para meio extracelular (FU *et al.*, 2012). Outra grande função das integrinas, é ancorar as células aos tecidos e contribuem ativamente em processos como da imunidade inata e regulação do crescimento celular. Sabe-se que, as integrinas  $\alpha 2\beta 1$  são expressas em plaquetas, células endoteliais, fibroblastos e regulam a migração de queratinócitos, controla a produção de VEGF na angiogênese, e também a polimerização de colágeno pelos fibroblastos (ROCA-CUSACHS *et al.*, 2012). A ALT-C ativa via integrina

processos de fosforilação da proteína kinase B (Akt/PKB), processo que envolve a sobrevivência das células endoteliais e angiogênese, promove ainda a quimiotaxia de neutrófilos através da cascata de sinais intracelular via integrina. A integrina  $\alpha 2\beta 1$  ativada promove processos de adesão, migração e proliferação celular (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005).

A avaliação dos efeitos da ALT-C em implantes de esponja sintéticos no subcutâneo de camundongos, apresentou efeito inibitório sobre dois componentes avaliados (angiogênese e inflamação) em todas as doses avaliadas, e um aumento no componente fibrogênico (colágeno) na maior dose avaliada. Além disso, nossos resultados sugerem que esses efeitos estão sendo modulados por citocinas.

O componente inflamatório foi avaliado tanto pelo infiltrado celular de neutrófilos, macrófagos e mastócitos como pela modulação desses eventos por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

O TNF- $\alpha$  é produzido primeiramente por monócitos e macrófagos ativados, sendo um potente agente pró-inflamatório capaz de induzir a desgranulação de neutrófilos, a liberação de leucotrienos, e a liberação de diversos mediadores da inflamação, tais como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 além de todos os metabolitos do ácido araquidônico (MOURA-DASILVA *et al.*, 2000). Tratamentos anti-TNF são bastante eficazes em doenças inflamatórias, tais como: artrite reumatoide, psoríase e doença de Crohn (WIEDMANN *et al.*, 2009). Estudos com desintegrinas têm mostrado os efeitos inibidores destas sobre o TNF. A Jararagina-C, que se identifica em 92% com a Alternagina-C, possui o mesmo motivo adesivo ECD, induziu transcrição de mRNA para TNF- $\alpha$  em cultura de células peritoneais após 4h. Isso pode sugerir uma aceleração na fase inicial da inflamação, podendo evitar um processo inflamatório crônico (SOUZA *et al.*, 2001). Kim e colaboradores (2006) demonstraram em seus estudos, que a desintegrina Saxatilin inibiu a proliferação de células cancerígenas e também a concentração de TNF- $\alpha$ , importante na ativação do promotor IL-8, que é conhecido por ser mediado por NF- $\kappa$ B e AP-1, que são duas vias críticas para a expressão de citocinas pró-inflamatórias em muitos tipos celulares (STEIN & BALDWIN, 1993). Nossos resultados vão de encontro à literatura uma vez que o tratamento com Alternagina-C reduziu significativamente o TNF- $\alpha$  em todas as doses avaliadas, sugerindo que esta desintegrina tem importante efeito anti-inflamatório.

Dentre as células ativadas durante uma resposta inflamatória, os neutrófilos estão entre as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório. Ao serem recrutados, os neutrófilos necessitam expressar integrinas específicas que permitem a adesão ao endotélio

dos vasos sanguíneos, e assim a migração para o tecido alvo. Uma vez ativadas, as integrinas controlam a organização do citoesqueleto de actina da célula, através de processos de polimerização de actina, permitindo então a migração celular (SALDANHA-GAMA *et al.*, 2010). As desintegrinas têm demonstrado um poder de inibição no recrutamento de neutrófilos, o que as transformaram em fortes candidatas nas terapias anti-inflamatórias. Entretanto, as desintegrinas podem também ativar os neutrófilos, evitando que entrem em apoptose, revelando uma complexidade nos efeitos das desintegrinas (COELHO *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2004). Pesquisas realizadas com neutrófilos *in vitro* envolvendo a ALT-C, com seu motivo adesivo ECD, mostraram que, ao se ligar à integrina  $\alpha 2\beta 1$ , a Alt-C induz a translocação de Erk-2 do citoplasma para o núcleo da célula via integrina, ativando também a fosforilação de FAK, podendo estar diretamente envolvidos no processo de migração dos neutrófilos, e assim mostrando seu efeito positivo no recrutamento destes leucócitos polimorfonucleares (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Por outro lado, Sant'Ana e colaboradores (2011), observaram que a Alt-C diminui o infiltrado inflamatório após cinco dias de tratamento em modelo de feridas excisionais em ratos. Esses resultados mostram que a Alternagina-C pode apresentar diferentes efeitos sobre o recrutamento de neutrófilos de acordo com a dose e modelo avaliados. Em nossos resultados não pudemos observar efeitos conclusivos sobre neutrófilos uma vez que os mesmos não apresentaram respostas significativas. Apesar disso, a redução da quimiocina para neutrófilos CXCL-1/KC, em nossos resultados, nos leva a inferir um possível efeito inibidor sobre essas células em nosso modelo, para o tempo de experimento estudado. É possível que esse efeito não tenha sido detectado, uma vez que, nosso experimento tem duração de nove dias e, de acordo com o trabalho de Sant'Ana e colaboradores (2011), entre o 3º e 5º dias de tratamento com a Alt-c há um aumento das células inflamatórias sendo que, após o 5º dia de tratamento, esse efeito se inverte, promovendo, assim, uma redução das células inflamatórias. Acreditamos que, como a quimiocina encontra-se reduzida, é possível que a redução de neutrófilos esteja acontecendo, mas seu nível no 9º dia de tratamento, esteja equiparado ao grupo controle.

Durante a inflamação crônica, monócitos circulantes são recrutados por quimiocinas como a CCL-2/JE/MCP-1 (proteínas quimiotáticas de monócitos-1), produzidas por células residentes, e ao chegarem ao tecido lesionado se tornam macrófagos ativos (HASKÓ, 2012). Uma vez ativados, os macrófagos irão produzir uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas que resultam na remodelação tecidual e recrutamento de leucócitos adicionais como os linfócitos B e T citotóxicos, antígeno-específicos, que irão ampliar a resposta imune (DE VISSER *et al.*, 2006). Essas

células também foram avaliadas em nosso trabalho e observamos um efeito significativo no tratamento com a Alt-c sobre macrófagos. A ALT-C foi capaz de reduzir tanto a concentração de NAG (atividade de macrófagos) como os níveis da principal quimiocina para o recrutamento e ativação de monócitos, a CCL2/JE/MCP-1. Os efeitos das desintegrinas sobre os monócitos vêm sendo demonstrados em diversos trabalhos com diferentes desintegrinas. Hsu e colaboradores (2010) demonstraram que Rhodostatin é capaz de inibir a ativação, migração e adesão de macrófagos através da interação com a integrina  $\alpha V\beta 3$  em macrófagos e monócito. Mercer e colaboradores (1998) mostraram que a contortrostatin, outra desintegrina derivada da peçonha de serpentes, inibe macrófagos via integrina  $\alpha V\beta 3$ . Em estudo anterior feito por Cassini e colaboradores (2014) em nosso laboratório, estudamos os efeitos da DisBa-01, uma desintegrina recombinante derivada da *Rhinoceros alternatus*, também seletiva para integrina  $\alpha V\beta 3$ , e observamos efeito inibitório tanto sobre macrófagos como nos níveis da quimiocina CCL-2/JE/MCP-1. Efeitos da Alt-C sobre macrófagos são relatados apenas no trabalho de Sant'Ana e colaboradores (2011), em feridas em ratos, o qual cita que o tratamento com essa desintegrina evitou processos de inflamação crônica por uma redução no número de células inflamatórias, dentre elas, macrófagos. Nosso trabalho é o primeiro a revelar os efeitos inibitórios da Alt-C especificamente sobre macrófagos e sua principal quimiocina, CCL-2/JE/MCP-1.

Os mastócitos são importantes células nos mecanismos de defesa do nosso organismo, e participam ativamente em processos inflamatórios crônicos, tais como, artrite reumatoide e esclerose múltipla. Geralmente não são encontrados na circulação e são derivados de progenitores hematopoiéticos na medula óssea, migrando para o tecido-alvo como células imaturas, e então acontece sua maturação (FRENZEL & HERMINE., 2013). O aumento da densidade de mastócitos é observado em diversas respostas inflamatórias, e nas reações alérgicas, por exemplo, os mastócitos secretam mediadores com o TNF- $\alpha$ , IL, e uma série de citocinas que irão promover o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (CURVINEL *et al.*, 2010). No entanto, de acordo com Frenzel e colaboradores (2013), embora os mastócitos sejam conhecidos principalmente pela sua participação em processos alérgicos, eles participam e regulam finamente processos inflamatórios crônicos e controlam a imunidade inata e adaptativa. Em estudos recentes para determinar se as integrinas dependentes do motivo RGD são responsáveis no processo de desgranulação de mastócitos, utilizando a desintegrina equistatina, que se liga a integrinas que possuem afinidades ao motivo adesivo RGD, foi possível mostrar uma diminuição significativa na desgranulação dos mastócitos, sem comprometer a viabilidade celular, e estes resultados mostraram que a

ativação de mastócitos pode ser feita via integrina e motivo RGD. Porém a participação das integrinas nesse processo, ainda não é bem conhecida (FOWLKES *et al.*, 2013). No nosso trabalho, a ALT-C que se liga as integrinas que possuem afinidade com o motivo adesivo ECD, diminuiu significativamente a quantidade de mastócitos na região inflamada, consequentemente menor produção de citocinas pró-inflamatórias e também menor recrutamento de células inflamatórias como os macrófagos. Ben-Zimra e colaboradores (2013) mostraram em seus estudos a importância da interação de eosinófilos e mastócitos nas alergias crônicas, e sugeriram que a integrina  $\beta$ -1 é uma das principais integrinas responsáveis na ativação de mastócitos. A ALT-C possui afinidade pela integrina  $\beta$ -1, e isso sugere que a ALT-C pode ter inibido o recrutamento de mastócitos via integrina  $\beta$ -1. Edelson e colaboradores, mostraram em seu estudos, que mastócitos peritoneais em processos inflamatórios expressam a integrinas  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, e isso pode sugerir também que a ALT-C pode ter bloqueado a atividade de mastócitos via integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1.

Conforme dito anteriormente, os macrófagos ativados irão produzir uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas em vários tipos celulares incluindo células epiteliais, células de origem mesenquimal e células endoteliais (DE VISSER *et al.*, 2006). Nesse trabalho, avaliamos os efeitos da ALT-C sobre a angiogênese através de parâmetros bioquímicos e morfológicos. Nossos resultados mostram um potente efeito anti-angiogênico em todos os parâmetros avaliados (conteúdo de hemoglobina, número de vasos e citocinas pró-angiogênicas (VEGF e FGF). De modo geral, as desintegrinas são descritas como potentes inibidores da angiogênese, apesar desse efeito ainda não ser completamente entendido (GOLUBKOV *et al.*, 2003). A maioria das desintegrinas estudadas possui o motivo adesivo RGD, e tem como alvo principalmente as integrinas  $\alpha$ v $\beta$ III, podendo inibir agregações plaquetárias mediadas por fibrinogênio e a angiogênese. Porém outros motivos adesivos também podem ser encontrados nas desintegrinas, tais como o MLD, KTS, VGD e o ECD (CALVETE, 2013). A ALT-C possui o motivo adesivo ECD, e em baixas concentrações induz proliferação de células endoteliais, ao contrario das desintegrinas que possuem o motivo adesivo RGD, que prejudica a sobrevivência destas células (COMINETTI *et al.*, 2004). A ALT-C ativa a fosforilação de Akt/PKB, importante via de sinalização que promove a sobrevivência das células endoteliais e a angiogênese (HONG *et al.*, 2013). Pesquisas realizadas por Tanjoni e colaboradores (2005), mostraram que a Jararagina, uma proteína tipo desintegrina com o motivo adesivo ECD, o mesmo motivo adesivo da ALT-C, induziu células endoteliais a entrarem em apoptose devido a ativações e alterações nas proteínas apoptóticas pró-caspases e também

na proporção de proteínas Bax e Bcl-xL. Ramos e colaboradores (2007), utilizando ensaio em tampão de matrigel, mostraram que a ALT-C funciona como um modulador da angiogênese, sendo que, em baixas concentrações (10nM) ela induz a proliferação de células HUVEC e, em altas concentrações (500nM), essa desintegrina teve um efeito inibidor da angiogênese. Observaram também que em menores doses (1 a 10nM), a expressão de VEGFR1 foi aumentada, e em concentrações maiores houve uma redução significativa em relação ao controle. No trabalho de Sant'Ana e colaboradores (2008) com feridas em ratos, mostraram que a expressão de VEGF foi diminuindo gradativamente no grupo controle até o sétimo dia, enquanto que o tratamento com baixas concentrações (< 100ng) aumentou sua expressão do VEGF. Tanto a produção do VEGF quanto o processo de migração de células endoteliais ocorrem através da interação com as integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  que, uma vez aderida ao colágeno tipo I, que possui motivo adesivo ECD, permite a migração das células endoteliais e assim a angiogênese. Ainda no trabalho de Sant'Ana e colaboradores (2008), o tratamento com a ALT-C mostrou-se um potente modulador de FGF, aumentando sua concentração até o terceiro dia após a lesão, em relação ao controle, e, diminuindo gradativamente sua expressão após o terceiro dia de tratamento. Apesar de a literatura mostrar um efeito dúbio, dose dependente, da Alt-C na angiogênese, em nosso modelo e com as doses estudadas, o que tivemos foi um potente efeito anti-angiogênico o qual está sendo modulado pelas citocinas VEGF e FGF.

Durante a fase de cicatrização, ou resolução do tecido lesionado, muitas alterações ocorrem: vasos sanguíneos no interior da lesão são refinados, redução da permeabilidade, ou seja, os vasos voltam ao seu estado normal, podendo formar uma rede de vasos maduros e funcionais (ADAMS & ALITALO, 2007). A matriz extracelular densa, que no início foi depositada ao acaso, se encontra em processo de remodelamento, com o objetivo de recuperar arquitetura inicial do tecido lesionado, e todo esse processo é devido ao fino e delicado processo de degradação e agregação de colágeno na matriz extracelular (HINZ, 2007; ULRICH *et al*, 2007). Com o objetivo de avaliar a formação da matriz extracelular depositada no implante, nós avaliamos a deposição de colágeno solúvel e total e os níveis de TGF- $\beta 1$ , principal citocina estimuladora de fibroblastos à produzir matriz. Nossos resultados revelaram um aumento da deposição de colágeno em todos os parâmetros avaliados no grupo tratado com a maior dose de Alt-C. Esse aumento da deposição de colágeno também pode ser observado quando avaliamos o peso úmido dos implantes o qual mostrou um aumento significativo na maior dose administrada. Esse aumento no peso do implante, mostra que houve um aumento do tecido fibrovascular para o implante no grupo tratado com a maior



dose. Esses resultados corroboram a literatura uma vez que os efeitos estimuladores da ALT-C sobre o colágeno e TGF já foram relatados. No trabalho de Sant'Ana e colaboradores (2011), a ALT-C aumentou a deposição de colágeno tipo I, porém o efeito foi menor para o colágeno tipo III, fato interessante, pois o colágeno tipo III é um colágeno imaturo, e esse tipo de colágeno não possui uma boa resistência, como acontece no colágeno tipo I. Os fibroblastos são importantes células no reparo tecidual e participam ativamente na cicatrização de feridas, pois secretam uma matriz provisória inicialmente e vários fatores de crescimento indispensáveis para o progresso do reparo tecidual (ELLIS *et al.*, 2007). De acordo com Sant'Ana e colaboradores (2011), a ALT-C aumentou a densidade de fibroblastos do terceiro ao quinto dia após a lesão em ratos e também a concentração da citocina TGF- $\alpha$ , e isso pode contribuir no aumento na deposição de colágeno. A ALT-C tem como alvo as integrinas  $\alpha 2\beta 1$ , é possível que ao mediar esta integrina, ALT-C intensifica a sinalização de fibroblastos, alterando a expressão gênica para o colágeno, e assim, acelerando processos inflamatórios, regeneração e o reparo tecidual.

Nosso trabalho foi o primeiro a mostrar os efeitos da ALT-C na inflamação crônica tendo como foco componentes importantes durante todo o processo como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, angiogênese e fibrogênese. Nossos resultados mostraram que a ALT-C pode ser um potente agente terapêutico no tratamento de patologias em que angiogênese e inflamação atuam de forma concomitante na manutenção da doença, além de favorecer o reparo tecidual, através da deposição de matriz. Além disso, nossos resultados ajudam na compreensão dos mecanismos envolvidos na sinalização das integrinas durante a resposta inflamatória.

## 6 - CONCLUSÕES

Em nosso trabalho, avaliamos os efeitos da ALT-C, uma desintegrina-like que se liga à integrina  $\alpha 2\beta 1$ , e observamos que essa desintegrina apresenta um potente efeito anti-angiogênico e anti-inflamatório, o que pode ser de extrema importância para conter processos patológicos os quais encontram-se de forma exacerbada. Além disso, observamos também, que essa desintegrina é capaz de favorecer a deposição de matriz (fibrogênese). Com isso, podemos concluir que a ALT-C pode ser um potente agente terapêutico que não apenas modula a inflamação e angiogênese, como favorece a fase tardia e resolutiva de um processo inflamatório o qual envolve a fibrogênese.

Como perspectivas, acreditamos ser importante tentar marcar alguns componentes do tecido fibrovascular através de imunohistoquímica ou Western Blot, além fazer uma cinética de tratamento. Essas análises nos ajudarão em uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos da ALT-C em nosso modelo.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, Ralf H.; ALITALO, Kari. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 6, p. 464-478, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2183>

ANDRADE, S.P., FAN, T.P.D., LEWIS, G.P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br. J. Exp. Path.**, v. 68, n. 6, p. 755-766, 1987.

ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; BELO, A.B.; TARSO, A.M.; BERALDO, W.T. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvasc. Res.**, Vol. 54, 1997, p 253-261. <https://doi.org/10.1006/mvre.1997.2047>

AHLUWALIA, A. AND A. S. TARNAWSKI "Critical Role Of Hypoxia Sensor--HIF1alpha In VEGF Gene Activation. Implications For Angiogenesis And Tissue Injury Healing." **Curr Med Chem** 19(1): 90-7, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712803413944>

ARAÚJO, F.A., ROCHA, M.A., MENDES, J.B., ANDRADE, S.P. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. **Biomed Pharmacother**, v. 64, p. 29-34, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.003>

ARAÚJO, F.A., et al., Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 2011. 38(4): p. 262-8. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05496.x>

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

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

BARCELOS, LS. et al. Role of the chemokines CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL5/ RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. **Microvascular Research**, v.78, n.2., p.148-154, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.04.009>

BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and tissue research** , v. 339, n. 1, p. 269–80, jan. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>

BEN-ZIMRA, M. et al. Eosinophil major basic protein activates human cord blood mast cells primed with fibroblast membranes by integrin- $\beta$ 1. **Allergy**, v. 68, n. 10, p. 1259-1268, 2013. <https://doi.org/10.1111/all.12232>

BJARNASON JB, FOX JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac Ther** 62: 325-372, 1994. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90049-3)

BURG, N.; PILLINGER, MH. The neutrophil: Function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, v.99, n.1, p.7-17, 2001. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5007>

CALVETE, J.J., MARCINKIEWICZ, C., MONLEON, D., ESTEVE, V., CELDA, B., JUÁREZ, P., SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxic**. Vol 45, 2005, p 1063-1074. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology** , v. 62, p. 40–9, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.005>

CAMPBELL, Iain D.; HUMPHRIES, Martin J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 3, p. a004994, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>

CARMELIET, P. Angiogênese in life, disease and medicine. **Nature**. Vol. 438, 2005, p 932-936. <https://doi.org/10.1038/nature04478>

CARMELIET, P. & JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nat.**, Vol. 407, 2000, p 249-257 <https://doi.org/10.1038/35025220>

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

CHAVAKIS, Triantafyllos et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides ( $\alpha$ -defensins): a link between inflammation and angiogenesis. **The FASEB journal**, v. 18, n. 11, p. 1306-1308, 2004. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1009fje>

COELHO, Ana Lucia J. et al. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Experimental cell research**, v. 251, n. 2, p. 379-387, 1999. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4583>

COELHO, Ana Lucia J. et al. RGD-and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Experimental cell research**, v. 292, n. 2, p. 371-384, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.09.013>

COMINETTI, M. R. et al. Alternagin- C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 18, p. 18247–55, 30 abr. 2004 <https://doi.org/10.1074/jbc.M311771200>

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**. Vol. 10, 2007, p 149-166. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9074-0>

CULMA, Maritza Fernández et al. Snake venomomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. **PeerJ**, v. 2, p. e246, 2014. <https://doi.org/10.7717/peerj.246>

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DAVIS, G.E., BAYLESS, K.J., DAVIS, M.J., MEININGER, G.A. Regulation of tissue injury responses by exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. **Am J Pathol**. Vol. 156, 2000, p 1489-1498. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65020-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65020-1)

DE PAULA, F.F.P.; RIBEIRO, J.U.; SANTOS, L.M.; DE SOUSA, D.H.F.; LOENARDECZ, E.; HENRIQUE-SILVA, F.; SELISTRE -DE-ARAÚJO, H.S. Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.12, p. 74-83, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.09.001>

DE SNET, F., SEGURA, I., DE BOCK, K., HOHENSINNER, P.J., CARMELIET, P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. Vol. 29, 2009, p 639-649.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185165>

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9–22, jan. 2010. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>

DOLEY, R. & KINI, R.M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**. Vol. 66, 2009, p 2851-2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>

DE VISSER, Karin E.; EICHTEN, Alexandra; COUSSENS, Lisa M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrc1782>

EDELSON, Brian T. et al. Novel collectin/C1q receptor mediates mast cell activation and innate immunity. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 143-150, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2218>

ELLIS, Ian R.; SCHOR, Ana M.; SCHOR, Seth L. EGF AND TGF- $\alpha$  motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms. **Experimental cell research**, v. 313, n. 4, p. 732-741, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.016>

FRENZEL, LAURENT; HERMINE, OLIVIER. Mast cells and inflammation. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 2, p. 141-145, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.013>

FOWLKES, Vennece et al. Mechanical loading promotes mast cell degranulation via RGD-integrin dependent pathways. **Journal of biomechanics**, v. 46, n. 4, p. 788-795, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.11.014>

FOX, Jay W.; SERRANO, Solange MT. 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, n. 12, p. 3016-3030, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>

FU, Guanyuan; WANG, Wei; LUO, Bing-Hao. Overview: structural biology of integrins. In: Integrin and Cell Adhesion Molecules. **Humana Press**, 2012. p. 81-99. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_7)

GERARD, C. & ROLLINS, B. J. (2001). Chemokines and disease. **Nat Immunol.**, 2(2), 108-115. <https://doi.org/10.1038/84209>

GOLUBKOV, Vladislav; HAWES, Debra; MARKLAND, Francis S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix snake venom. **Angiogenesis**, v. 6, n. 3, p. 213-224, 2003. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000021396.47009.b0>

GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. **AMA Arch. Surg.** Vol. 63, 1951, p 288-297.  
<https://doi.org/10.1001/archsurg.1951.01250040294003>

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

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

HITE, L.A., JIA L.G.,BJARNASON J.B. AND FOX J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** Vol. 308, 1994, 182-191.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1026>

HOEBEN, A., B. LANDUYT, ET AL. (2004). "Vascular Endothelial Growth Factor And Angiogenesis." **Pharmacol Rev** 56(4): 549-80. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3>

HONG, Sung-Yu et al. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 302, n. 3, p. 502-508, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00213-4)

HSU. CC. et al. Improvements in endotoxemic syndromes using a disintegrin, rhodostomin, through integrin  $\alpha\beta 3$  -dependent pathway. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, n.2, p.593-602, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04163.x>

JACKSON, J.R.; BOLOGNESE, B.; KIRCHER, C.H.; MARSHALL, L.A.; WINKLER, J.D. Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation. **Inflamm. Res.** Vol. 46, 1997, p S129-30. <https://doi.org/10.1007/s000110050139>

JUNIOR, LUIZ ANTONIO JUSTULIN. Reposição hormonal na prostata ventral de ratos castrados: recuperação glandular, reorganização estromal e atividade de metaloproteinases de matriz. 2005.

KAMIGUTI, A. S. et al. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1097-1105, 1991.  
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90207-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90207-8)

KIM, Dong Seok et al. Saxatilin inhibits TNF- $\alpha$ -induced proliferation by suppressing AP-1-dependent IL-8 expression in the ovarian cancer cell line MDAH 2774. **Molecular immunology**, v. 44, n. 6, p. 1409-1416, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.05.001>

KOIVISTO, Leeni et al. Integrins in wound healing. **Advances in wound care**, v. 3, n. 12, p. 762-783, 2014. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0436>

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: The Leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v.7, n.9, p.678-689, 2007. <https://doi.org/10.1038/nri2156>

LIU-ST et al. Src as the link between inflammation and cancer. **Frontiers in Physiology**, v.416, n.4, p.1-6, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00416>

LU, Pengfei et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 12, p. a005058, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>

LU, Q., NAVDAEV, A., CLEMETSON, J.M. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. **Toxic**. Vol 45, 2005, p 1089-1098. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.022>

MAJNO G, (1975) The Healing Hand - Man and wound in the ancient world. **Harvard University Press, Cambridge, MA** (1975).

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

MENDES, J.B., ROCHA, M.A., ARAÚJO, F.A., MOURA, S.A., FERREIRA, M.A., ANDRADE, S.P. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvasc Res.**, v.78, p. 265-71, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.08.008>

MENDES, J.B.; CAMPOS, P.P.; FERREIRA, M.A.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **J. Biom. Mat. Res. B. Appl. Biomater.**, Vol. 83, 2007, p. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30810>

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



MEDZHITOV.R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n.6, p.771-776, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>

MEYER, A., AUERNHEIMER, J., MODLINGER, A., KESSLER, H. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Pharm Des*. Vol. 12, 2006, p 2723-2747. <https://doi.org/10.2174/138161206777947740>

MERCER, B.; MARKLAND, F.; MINKIN, C. Contortrostatin, a homodimeric snake venom disintegrin, is a potent inhibitor of osteoclast attachment. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 13, n. 3, p. 409-414, 1998. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.409>

MOELLER, Antje et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 179, n. 7, p. 588-594, 2009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1534OC>

MOURA-DA-SILVA, Ana Maria et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *European journal of immunology*, v. 26, n. 9, p. 2000-2005, 1996. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260905>

MUNDEL, Thomas M.; KALLURI, Raghu. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. *Microvascular research*, v. 74, n. 2, p. 85-89, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.05.005>

NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A.; VOLIN, M. V.; GAMELLI, R. H. & Di PIETRO, L. A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.* 152, 1445-1452.

NEWBY, A.C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Vol. 28, 2008, p 2108-2114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.173898>

OKIN, DANIEL; MEDZHITOV, Ruslan. Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.029>

ORTEGA-GOMEZ, A.; PERETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *Molecular Medicine*, v.5, n.5, p.661-674, 2013. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>

PERES, Luis Alberto Batista et al. Biomarkers of acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 35, n. 3, p. 229-236, 2013. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>

RAMJAUM, AR.; HODIVALA-DILKE, K.The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *The Internacional Journal of Bichemistry & Cell Biology*, p.523, 2009.

RAMJAUN, A.R. & HODIVALA-DILKE, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.** Vol. 41, 2009, p 521-530.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.05.030>

RAMOS, Oscar HP et al. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 461, n. 1, p. 1-6, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.021>

ROCA-CUSACHS, Pere; ISKRATSCH, Thomas; SHEETZ, Michael P. Finding the weakest link—exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. **Journal of cell science**, v. 125, n. 13, p. 3025-3038, 2012. <https://doi.org/10.1242/jcs.095794>

ROCHA, L.T., COSTA, K.A., OLIVEIRA, A.C., NASCIMENTO, E.B. Jr., BERTOLLO, C.M., ARAÚJO, F., TEIXEIRA, L.R., ANDRADE, S.P., BERALDO, H., COELHO, M.M. Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. **Life Sci.**, v.79, n.5, p. 499-505, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.027>

ROY, R., ZHANG, B., MOSES, M.A. Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis. **Exp Cell Res.** Vol. 312, 2006, p 608-622.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.022>

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu Rev Cell Dev Biol.** Vol. 12, 1996, p 697-715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>

RUSSEL, Findlay E. Snake venom poisoning in the United States. **Annual review of medicine**, v. 31, n. 1, p. 247-259, 1980.

<https://doi.org/10.1146/annurev.me.31.020180.001335>

SALDANHA-GAMA, Roberta F. et al.  $\alpha 9 \beta 1$  integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 7, p. 848-857, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.012>

SANT'ANA, Estela Maria Correia et al. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 479, n. 1, p. 20-27, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.07.030>

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

SARASWATI, S.; AGARWAL, SS. Strychnine inhibits inflammatory angiogenesis in mice via down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . **Microvascular Research**, v.87, p.7-13, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.01.003>

SAVARIS, N. Resposta imunoinflamatória à circulação extracorpórea: estado atual. **Rev. bras. anesthesiol**, v. 48, n. 2, p. 126-36, 1998.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 10, p. 1505-1511, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001000007>

SELISTRE-DE-ARAÚJO, HS. Et al. Snake Venom disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.2, n.11, p. 2606-2601; 2010. <https://doi.org/10.3390/toxins2112606>

SENGER, Donald R.; DAVIS, George E. Angiogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a005090, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005090>

SOUZA ,IEMMA, FERREIRA, FARIA, OLIVA, ZINGALI, NIEWIAROWSKI E SELISTRE-DE-ARAÚJO. The Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits  $\alpha 2\beta 1$  Integrin-Mediated Cell Adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 384: 341–350, 2000. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2120>

SOUZA, Dulce HF et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* snake venom. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 8, p. 1135-1137, 2001. <https://doi.org/10.1107/S090744490100614X>

STEIN, B.; BALDWIN, A. S. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 11, p. 7191-7198, 1993. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.11.7191>  
SU, Libo et al. Coinfection with an intestinal helminth impairs host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and exacerbates intestinal inflammation in mice. **Infection and immunity**, v. 82, n. 9, p. 3855-3866, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-2945-1>

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

TAKEDA, Soichi; TAKEYA, Hiroyuki; IWANAGA, Sadaaki. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **AdvExp Med Biol**. Vol. 391, 1988, p 37-62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0361-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0361-9_3)

VAN DER VORST, Emiel PC et al. Myeloid A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 10 Deficiency Modulates Atherosclerotic Plaque Composition by Shifting the Balance from Inflammation toward Fibrosis. **The American journal of pathology**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.028>

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

WEGENER, Kate L.; CAMPBELL, Iain D. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). **Molecular membrane biology**, v. 25, n. 5, p. 376-387, 2008. <https://doi.org/10.1080/09687680802269886>

WIEDMANN, Marcus W. et al. TNF alpha inhibition as treatment modality for certain rheumatologic and gastrointestinal diseases. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 9, n. 3, p. 295-314, 2009. <https://doi.org/10.2174/187153009789044347>

WOLFENSON, H.; LAVELIN, I.; GEIGER, B. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Cell*, v.24, n.5, p.447-457, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.012>

ZICHE, M., A. PARENTI, Et Al. (1997). "Nitric Oxide Promotes Proliferation And Plasminogen Activator Production By Coronary Venular Endothelium Through Endogenous Bfgf." **Circ Res** 80(6): 845-52. <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.6.845>

ZHOU, Jin et al. Salvicine inactivates  $\beta 1$  integrin and inhibits adhesion of MDA-MB-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species signaling. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 194-204, 2008. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0197>