

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DO EFEITO DA ALTERNAGINA-C, UMA DESINTEGRINA DO  
VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* E DE UM PEPTÍDEO  
SINTÉTICO DERIVADO DE SUA ESTRUTURA, SOBRE A EXPRESSÃO  
DE FATORES DE CRESCIMENTO, ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO  
DE LESÃO EM PELE DE RATO.**

**ESTELA MARIA CORREIA SANT'ANA**

**São Carlos  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DO EFEITO DA ALTERNAGINA-C, UMA DESINTEGRINA DO  
VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* E DE UM PEPTÍDEO  
SINTÉTICO DERIVADO DE SUA ESTRUTURA, SOBRE A EXPRESSÃO  
DE FATORES DE CRESCIMENTO, ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO  
DE LESÃO EM PELE DE RATO.**

**ESTELA MARIA CORREIA SANT'ANA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo.

Co-orientador: Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa.

**São Carlos  
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S232ee

Sant'Ana, Estela Maria Correia.

Estudo do efeito da Alternagina-C, uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus* e de um peptídeo sintético derivado de sua estrutura, sobre a expressão de fatores de crescimento, angiogênese e cicatrização de lesão em pele de rato / Estela Maria Correia Sant'Ana. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

71 f.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Alternagina-C. 2. Desintegrina. 3. Neovascularização. 4. Fator de crescimento. 5. Pele – regeneração. I. Título.

CDD: 574.19296 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Estela Maria Correia Sant'Ana

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo ..... 

Prof. Dr. Oscar Henrique Pereira Ramos ..... 

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel ..... 

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Alice da Cruz Hofling ..... 

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva ..... 



"Nunca se deve passar depressa pelas emoções.  
Algumas são maiores: nascimento, casamento - aliança por um objetivo...  
Só se poderá lembrar do objetivo, se no dia sentirmos emoções.  
O que volta na memória não é um processo estático; hoje já sabemos: é dinâmico.  
Como é importante registrar as emoções! Quanto mais você as tem, mais você cria.  
Assim se dá o processo que é o Sentir."

**Dr. Celso Charuri**

## AGRADECIMENTOS

São tantos amigos a agradecer... Pessoas direta ou indiretamente envolvidas...

À professora **Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo** minha orientadora, pela oportunidade e confiança em mim depositadas e por nortear esse trabalho de forma tão competente.

Ao professor **Luis Carlos Uchoa Junqueira** (in memória) pela atenção dispensada e por vislumbrar este trabalho como um possível complemento aos estudos da expressão de colágeno pelos fibroblastos.

À **Rita de Cássia Marqueti**, irmã de espírito que encontrei pelo caminho. Pela sua lealdade, por partilhar esperanças e cuidados, sinceros agradecimentos.

Aos meus filhos, **Vanessa e Igor**, bases da minha determinação e vontade de vencer. Novamente peço desculpas pelos momentos de ausência.

Ao meu marido **Regis**, que de manso chegou e logo se tornou membro da família. Indispensável na sua alegria, amigo para todas as horas e companheiro para sempre.

Aos **professores** do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e da UNESP - Araraquara, pela acolhida e atenção dispensadas.

Aos **colegas** de laboratório e disciplinas, agradeço pelo apoio, compartilhando dificuldades e resultados.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À professora **Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa**, mestre na essência, ser humano de corpo e alma. Pelo encorajamento e confiança, muito mais que uma colaboradora, uma verdadeira amiga, meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

A angiogênese e o reparo tecidual são mediados por vários fatores de crescimento estritamente liberados. A Alternagina-C (ALT-C), uma proteína tipo-desintegrina derivada do veneno de *Bothrops alternatus* induz angiogênese *in vivo*, bem como, o peptídeo cíclico derivado de sua estrutura primária contendo o motivo ECD (ALT-C PEP). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ALT-C e do ALT-C PEP sobre a angiogênese e a expressão de fatores de crescimento em um modelo de lesão em pele de rato. Os animais foram anestesiados e foi induzida uma lesão esférica, com *punch* de 4 mm, na região interescapular. Os animais foram divididos em 7 grupos (5 ratos/grupo): controle (tratado com veículo); tratados com ALT-C (10, 60 ou 100 ng) e ou de ALT-C PEP (10, 20 ou 100 ng) por 1, 3, 5 e 7 dias consecutivos. Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia, a pele lesada foi removida e dividida ao meio. A porção cranial foi usada para análise histológica e da porção caudal, as proteínas foram extraídas, separadas por SDS-PAGE e a expressão de VEGF, FGF-1, TGF $\beta$ 1, PDGF, IGF1 e TGF $\alpha$  foi analisada por *Western blotting*. Os resultados demonstram que ambos, ALT-C e ALT-C PEP induzem a formação de novos vasos, estimulam a síntese de colágeno e modulam a expressão de fatores de crescimento, principalmente VEGF e FGF1. O aumento da expressão de VEGF pôde ser detectado até 7 dias após a lesão. O FGF1 também aumentou significativamente, mas em menor extensão do que o VEGF. Em conclusão, apresentamos uma proteína pertencente ao grupo das desintegrinas de veneno de serpentes que estimula a angiogênese e induz a síntese de colágeno em tecido lesado. A ALT-C pode exercer os seus efeitos via ligação com integrina vinculada à modulação de fatores de crescimento. Como a angiogênese é um acontecimento importante para a cicatrização, ambos, ALT-C e ALT-C PEP parecem ser bons candidatos para o desenvolvimento de um novo fármaco auxiliar da regeneração de pele lesada.

## ABSTRACT

Angiogenesis and wound repair are mediated by several growth factors that are strictly released. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus* induces *in vivo* angiogenesis as well as the cyclic peptide derived from its primary structure, with the ECD motif (ALT-C PEP). This study investigated the effects of ALT-C and ALT-C PEP on angiogenesis and expression of growth factors in a model of wounded rat skin. The rats were anaesthetized; one cutaneous excision (4 mm diameter) was made on the back of each animal, close to the cervical area. Animals were then divided into 7 groups (five rats/group): control (treated with vehicle); locally treated with 10, 60 and 100 ng ALT-C or 10, 20 and 100 ng ALT-C PEP ALT-C PEP for 1, 3, 5 or 7 consecutive days. At the end of experiments animals were killed, the skin was removed; the cranial portion was used for histological analysis and from the caudal portion; protein were extracted, separated by SDS-PAGE and VEGF, FGF-1, TGF $\beta$ 1, PDGF, IGF1 e TGF $\alpha$  expression was analyze a by Western blotting. The results show that both, ALT-C and ALT-C PEP induced the formation of new vessels, stimulate collagen synthesis and modulated the expression of growth factors, mainly VEGF and FGF1. The increase in VEGF expression could be detected up to 7 days after injury. FGF1 was also significantly increased, but at a lesser extension than VEGF. In conclusion, we present a protein belonging to the disintegrin group of snake venom toxins stimulates angiogenesis and collagen synthesis in an injured tissue. ALT-C may exert its effects via integrin binding and growth factor modulation. As angiogenesis is an important event for wound healing, ALT-C and ALT-C PEP could be candidates to the development of a new drug for wounded skin repair or regeneration.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	Proteína que apresenta os domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina ( <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> )
ALT-C	Alternagina C
ALT-C PEP	Peptídeo cíclico derivado da Alternagina C
BSA	Soro albumina bovina ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
ECD	Seqüência adesiva tripeptídica de aminoácidos: ácido glutâmico- cisteína-ácido aspártico (Glu-Cys-Asp)
EGF	Fator de crescimento da epiderme ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFR	Receptor do fator de crescimento da epiderme ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
FAK	Tirosina quinase de adesão focal ( <i>Focal Adhesion Kinase</i> )
FGF-1/ aFGF	Fator de crescimento do fibroblasto-1/ Fator de crescimento do fibroblasto ácido ( <i>acid Fibroblast Growth Factor</i> )
FGF-2/ bFGF	Fator de crescimento do fibroblasto-2/ Fator de crescimento do fibroblasto básico ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> )
fMLP	Peptídeo <i>N</i> -formil-metionil leucil-fenilalanina
GH	Hormônio de crescimento ( <i>Growth Hormone</i> )
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana ( <i>Human Umbelical Vein Endothelial Cells</i> )
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1 ( <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i> )
ILK	Quinase ligada a integrina ( <i>Integrin-Linked Kinase</i> )
KGD	Seqüência tripeptídica de aminoácidos: lisina, glicina e ácido aspártico (Lys-Gly-Asp)
KGF-1	Fator de crescimento do queratinócito-1 ( <i>Keratinocyte Growth Factor-1</i> )
KGF-2	Fator de crescimento do queratinócito-2 ( <i>Keratinocyte Growth Factor-2</i> )
MDC	Proteínas que possuem domínios metalopeptidase, desintegrina e rico em cisteínas ( <i>Metalloproteinase-like Disintegrin-like Cysteine-rich</i> )

MEC	Matriz extracelular
MMP	Metalopeptidases de matriz ( <i>Matrix Metalloproteinases</i> )
PBS	Salina tamponada por sulfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
PDGFR $\alpha$ e $\beta$	Receptor $\alpha$ (ou $\beta$ ) de fator de crescimento derivado das plaquetas ( <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i> )
PVDF	Fluoreto (ou Difluoreto) de Polivinilideno ( <i>Polyvinylidene Fluoride</i> )
RGD	Seqüência tripeptídica de aminoácidos: arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp)
SVMP	Metalopeptidases de veneno de serpente ( <i>Snake Venom Metalloproteases</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecil Sulfate</i> )
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ( <i>Polyarylamide Gel Electrophoresis</i> )
TGF $\alpha$	Fator de crescimento transformante alfa ( <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i> )
TGF $\beta$	Fator de crescimento transformante beta ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
TGF $\beta$ 1	Fator de crescimento transformante beta-1 ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1</i> )
TIMP	Inibidores teciduais de metalopeptidases ( <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteases</i> )
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> )
TEMED	N,N,N",N"-Tetrametiletileno-diamino

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Metalopectidases de matriz classificadas conforme a especificidade.....	4
<b>TABELA 2</b>	Características de domínios desintegrina baseando-se em seqüência, padrão de pontes dissulfeto e relações evolucionárias.....	7
<b>TABELA 3</b>	Integrinas, seus ligantes endógenos e suas distribuições celulares.....	8

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Diagrama da família das integrinas e suas interações específicas com os diferentes motivos (tripeptídeos) das desintegrinas de veneno de serpentes.....	9
<b>FIGURA 2.</b>	Integrinas que se ligam preferencialmente ao colágeno.....	11
<b>FIGURA 3.</b>	Diagrama estrutural do complexo domínio I-colágeno da integrina $\alpha 2\beta 1$ ...	12
<b>FIGURA 4.</b>	Representação esquemática da cascata de sinalização intracelular ativada por contato focal mediado por integrinas.....	13
<b>FIGURA 5.</b>	Representação esquemática das camadas da pele.....	16
<b>FIGURA 6.</b>	Representação esquemática dos diferentes estágios do reparo tecidual.....	17
<b>FIGURA 7.</b>	Fases da angiogênese fisiológica.....	21
<b>FIGURA 8.</b>	A, esquema representativo do <i>punch</i> ou vazador, utilizado como instrumento para promover a lesão neste modelo experimental; B, modelo de lesão cutânea promovida por <i>punch</i> (4 mm de diâmetro) em pele do dorso de rato.....	27
<b>FIGURA 9.</b>	Diagrama dos grupos experimentais: grupos controle e grupos tratados com ALT-C ou com ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias consecutivos.....	28
<b>FIGURA 10.</b>	Fragmento de pele de rato lesada utilizado nas análises.....	29
<b>FIGURA 11.</b>	Densidade de vasos sanguíneos em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o controle (média $\pm$ erro padrão da média).....	34
<b>FIGURA 12.</b>	Densidade de fibroblastos em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o controle (média $\pm$ erro padrão da média).....	35
<b>FIGURA 13.</b>	Densidade de colágeno em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o controle (média $\pm$ erro padrão da média).....	36

<b>FIGURA 14.</b>	Densidade de células inflamatórias em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o controle (média $\pm$ erro padrão da média).....	37
<b>FIGURA 15</b>	Fotomicrografia corada com hematoxilina-eosina de pele de rato lesada, grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C por 1, 3, 5 e 7 dias pós-lesão.....	38
<b>FIGURA 16.</b>	Fotomicrografia corada com hematoxilina-eosina de pele de rato lesada, grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias pós-lesão.....	39
<b>FIGURA 17.</b>	Fotomicrografia corada com picrossírius-hematoxilina de pele de rato lesada, grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C por 1, 3, 5 e 7 dias pós-lesão.....	40
<b>FIGURA 18.</b>	Fotomicrografia corada com picrossírius -hematoxilina de pele de rato lesada, grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias pós-lesão.....	41
<b>FIGURA 19.</b>	Expressão de VEGF no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias.....	43
<b>FIGURA 20.</b>	Expressão de FGF-1 no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias.....	44
<b>FIGURA 21.</b>	Expressão de TGF $\beta$ 1 no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP tratados por 1, 3, 5 e 7 dias.....	46
<b>FIGURA 22.</b>	Expressão de PDGF no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias.....	47
<b>FIGURA 23.</b>	Expressão de IGF-1 no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias.....	48
<b>FIGURA 24.</b>	Expressão de TGF $\alpha$ no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias.....	49





## SUMÁRIO

	p
1. <b>INTRODUÇÃO.....</b>	1
1.1 <b>Veneno botrópico.....</b>	1
1.2 <b>Metalopeptidases.....</b>	2
1.2.1 <b>Metalopeptidases de veneno de serpente.....</b>	5
1.2.2 <b>Desintegrinas.....</b>	6
1.3 <b>Integrinas.....</b>	7
1.3.1 <b>Interação integrina-colágeno.....</b>	10
1.3.2 <b>Sinalização intracelular via integrina.....</b>	12
1.4 <b>Alternagina, Alternagina-C e peptídeo derivado da Alternagina-C.....</b>	14
1.5 <b>Pele: estrutura, lesão e cicatrização.....</b>	15
1.5.1 <b>Estrutura histológica da pele.....</b>	15
1.5.2 <b>Lesão cortante/incisiva na pele.....</b>	16
1.5.3 <b>Cicatrização da pele.....</b>	18
1.5.3.1 <b>Fase inflamatória: hemostasia e inflamação.....</b>	18
1.5.3.2 <b>Fase proliferativa: epitelização, angiogênese e formação de matriz extracelular provisória.....</b>	19
1.5.3.3 <b>Maturação e remodelagem.....</b>	20
1.6 <b>Angiogênese.....</b>	21
1.7 <b>Fatores de crescimento.....</b>	22
2 <b>OBJETIVOS.....</b>	25
3 <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	26
3.1 <b>Obtenção da ALT-C e do ALT-c PEP.....</b>	26
3.2 <b>Modelo experimental.....</b>	26
3.3 <b>Procedimento cirúrgico.....</b>	26
3.4 <b>Grupos experimentais e tratamento.....</b>	27
3.5 <b>Análise histológica.....</b>	29
3.6 <b>Extração de proteínas.....</b>	29
3.7 <b>Dosagem de proteínas.....</b>	30

3.8	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....</b>	30
3.9	<b><i>Western blotting</i>.....</b>	31
3.10	<b>Análise estatística.....</b>	32
4	<b>RESULTADOS.....</b>	33
4.1	<b>Análise histológica.....</b>	33
4.2	<b>Efeitos da ALT-C e do ALT-C PEP sobre expressão de fatores de crescimento.....</b>	42
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	50
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	56
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Veneno botrópico

Os venenos de serpentes são misturas complexas, farmacologicamente ativas de proteínas e peptídeos, além de pequena proporção de outros componentes como lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e minerais. Os venenos de serpentes podem apresentar variações na composição, observadas entre as famílias, gêneros e espécies de serpentes ou mesmo dentro de uma mesma espécie (ROODT et al., 2003; ROCHA & FURTADO, 2005). Essas diferenças intra-específicas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais (STANCHI et al., 1999; ROCHA & FURTADO, 2005).

As serpentes venenosas estão distribuídas em quatro famílias: Viperidae; Atractaspididae; Elapidae e Colubridae (FOX & SERRANO, 2008).

No Brasil, a família Viperidae, tem como representante os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. O gênero *Bothrops* compreende 32 diferentes espécies de serpentes. Algumas espécies foram melhor estudadas, sendo elas: *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. jararacussu* (STANCHI et al., 1999).

A *B. alternatus*, conhecida popularmente como urutu, ocorre na região central, sudeste e sul do Brasil chegando até a região central da Argentina e limite meridional do Uruguai (ROCHA & FURTADO, 2005).

O veneno da *B. alternatus* quando inoculado, possui ação primariamente local e secundariamente sistêmica, provocando alterações no fígado, baço e rins (ROCHA & FURTADO, 2005). Essas alterações são causadas por proteínas tóxicas que podem ser classificados em dois grandes grupos: as neurotoxinas e as hemorraginas (CALVETE et al., 2005). Os efeitos hemorrágicos observados são causados pelo efeito sinérgico de diversas toxinas

do veneno, contudo os efeitos hemorrágicos primários são promovidos pelas metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs) (JIA et al, 1997; MAZZI et al., 2007).

## 1.2 Metalopeptidases

As metalopeptidases (MPs) são um grupo de endopeptidases classificadas em cinco superfamílias, sendo uma delas a superfamília metzincina. A superfamília metzincina por sua vez, é subdividida em 4 famílias: as serralinas, as astacinas, as adamalisinas e as matrixilinas (metalopeptidases de matriz) (HUXLEY-JONES et al., 2007).

As metalopeptidases de matriz (MMPs) compreendem uma família de endopeptidases com atividade hidrolítica, que contém zinco e são dependentes de cálcio. As MMPs possuem papel central na remodelagem dos tecidos e atuam sobre inúmeras proteínas extracelulares, incluindo colágeno, elastina, gelatina, glicoproteínas da matriz e proteoglicanas (VERMA & HANSCH, 2007; ATKINSON et al., 2007). Em condições fisiológicas são minimamente expressas e, não só nestas condições, são reguladas por hormônios, fatores de crescimento e citocinas. O controle da expressão das MMPs pode ocorrer durante a transcrição gênica, durante o processamento de RNAs e ainda pela ativação do zimogênio ou por inativação da enzima ativa promovida por inibidores teciduais de metalopeptidases (TIMPs). Alguns tipos de MMPs são altamente expressas durante o reparo e regeneração tecidual (PARKS, 1999; ROY et al., 2006; VERMA & HANSCH, 2007).

Mais de 20 diferentes tipos de MMPs estão bem caracterizadas e membros adicionais continuam sendo identificados. Para a classificação das MMPs podem ser considerados aspectos funcionais (substrato específico e localização celular) ou estruturais. Todas as MMPs têm algumas características em comum tais como: possuem um sítio ativo contendo  $Zn^{2+}$  que se liga a um motivo conservado contendo histidina (HEXXHXXGXXH); contêm um pró-domínio de aproximadamente 80 aminoácidos e uma seqüência consenso. As MMPs sempre são sintetizadas como zimogênios inativos e são seqüencialmente processadas por outras enzimas proteolíticas (serinoproteases, furina, plasmina e outras) para gerar formas ativas. As MMPs são secretadas por uma variedade de células incluindo fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e células pró-inflamatórias tais como, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (BIRKEDAL-HANSEN et al.; 1993; PARKS, 1999; VERMA & HANSCH, 2007).

Com base na especificidade as MMPs são classificadas em collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), gelatinases (MMP-2, MMP-9), matrilisinas (MMP-7, MMP-26) estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-27) e tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25). Há também alguns membros da família das MMPs que possuem características especiais que impedem sua inserção nos grupos acima citados (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-28, MMP-29). Os substratos e a produção de células indicam que quase todos os componentes da MEC podem ser degradados por MMPs produzidas localmente (LOHI et al., 2001; KATSUDA et al., 2003; VISSE & NAGASE, 2003, VERMA & HANSCH, 2007) (Tabela 1).

Por vários anos após sua descoberta, acreditou-se que as MMPs tinham como função primária a regulação da composição da matriz extracelular (MEC), o que facilitava a migração celular simplesmente por remover as barreiras formadas pelo colágeno. Isso está bem estabelecido, contudo, estudos indicam que as MMPs atuam também na regulação funcional de moléculas não componentes da MEC, incluindo fatores de crescimento e seus receptores, citocinas, quimiocinas, receptores de adesão, proteoglicanas de superfície celular, além de grande variedade de enzimas (STAMENKOVIC, 2003; VAN LINT & LIBERT, 2007).

**Tabela 1.** Metalopeptidases de matriz classificadas conforme a especificidade.

<b>Nome do grupo</b>	<b>Número da MMP</b>	<b>Substratos</b>	<b>Fontes celulares</b>
<b>1. Colagenases</b>			
Colagenase-1	MMP-1	Colágeno I, II, III, VII, X, gelatina proteoglicana, proteína símili, entactina, tenascina	Macrófagos, células do músculo liso, células endoteliais
Colagenase-2	MMP-8	Colágeno I, II, III, gelatina, proteoglicana, proteína símili	Neutrófilos, macrófagos, células do músculo liso, células endoteliais
Colagenase-3	MMP-13	Colágeno I, II, III, IV, IX, XVI, proteoglicana, fibronectina, tenascina	Macrófagos, células do músculo liso, células endoteliais
Colagenase 4	MMP-18	Colágeno I	-
<b>2. Gelatinases</b>			
Gelatinase-A	MMP-2	Gelatina, colágeno I, IV, V, VII, X, XI, laminina, fibronectina, elastina, proteoglicana, proteína símili	Células do músculo liso, macrófagos, células endoteliais, linfócitos T
Gelatinase-B	MMP-9	Gelatina, colágeno III, IV, V, elastina, entactina, proteína símili	Macrófagos, células do músculo liso, células endoteliais, linfócitos T
<b>3. Matrilisinas</b>			
Matrilisina 1	MMP-7	Proteoglicanas, gelatina, fibronectina, tenascina, elastina, colágeno IV, laminina, proteína símili	Macrófagos
Matrilisina 2	MMP-26	Colágeno IV, fibronectina, gelatina	
<b>4. Estromelisinases</b>			
Estromelisinases 1	MMP-3	Proteoglicanas, colágeno III, IV, IX, X, laminina, fibronectina, gelatina, tenascina, proteína símili, elastina	Macrófagos, células do músculo liso
Estromelisinases 2	MMP-10	Colágeno III, IV, V, fibronectina, laminina, proteoglicanas, proteína símili, elastina	-
Estromelisinases 3	MMP-11	Fibronectina, laminina, proteoglicanas, gelatina	-
<b>4. Tipo membrana</b>			
MT1-MMP	MMP-14	Colágeno I, II, III, gelatina, proteoglicanas, fibronectina, laminina	Células do músculo liso, células endoteliais, macrófagos
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectina, tenascina, entactina, agrecana, perlecana, laminina	-
MT3-MMP	MMP-16	Colágeno III, gelatina, fibronectina	-
MT4-MMP	MMP-17	?	-
MT5-MMP	MMP-24	Proteoglicanas	-
MT6-MMP	MMP-25	Gelatina	-
<b>5. Outras</b>			
Metaloelastase	MMP-12	Elastina	Macrófagos
RAS I-1	MMP-19	Tenascina, gelatina, agrecana	-
Enamelisina	MMP-20	Enamela, gelatina	-
X-MMP	MMP-21	?	-
CA-MMP	MMP-23	?	-
C-MMP	MMP-27	Caseína	Queratinócitos
Epilisina	MMP-28	Caseína	Queratinócitos

### 1.2.1 Metalopeptidases de veneno de serpente

As metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs) compreendem uma subfamília de enzimas dependentes de zinco, com distintas massas moleculares e presentes em grande quantidade nos venenos de serpentes. São os principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos característicos do envenenamento por Viperidae e Crotalidae (JIA et al., 1997; MOURA-DA-SILVA et al., 2003; CALVETE, 2005; CALVETE et al., 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

As SVMPs podem ser classificadas de acordo com seus domínios estruturais em quatro classes. As metalopeptidases P-I (20-30 kDa) possuem apenas um domínio metalopeptidase com atividade hemorrágica relativamente fraca. A classe P-II (30-60 kDa), uma desintegrina clássica, contém um domínio desintegrina na terminação carboxi-terminal, um domínio metalopeptidase estruturalmente similar ao da classe PI e, freqüentemente, se encontra processada no veneno. A classe P-III contém grandes toxinas (60-100 kDa) com uma potente atividade hemorrágica e encerra multidomínios estruturais, sendo um domínio metalopeptidase N-terminal, um domínio tipo-desintegrina e um domínio rico em cisteínas. São encontradas nos venenos na forma dimérica ou monomérica ou ainda, na forma processada enzimaticamente inativa contendo apenas os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas. O domínio metalopeptidase (ou catalítico) possui atividade de endopeptidase metalo-dependente e é composto por 215 resíduos de aminoácidos. Já o domínio tipo-desintegrina pode variar em tamanho (~ 100 resíduos) e, ao invés da seqüência desintegrinas RGD (Arg, Gly, Asp), possui a seqüência adesiva tipo-desintegrina ECD (Glu, Cys, Asp). O domínio rico em cisteínas possui alta densidade de cisteínas. A classe P-IV possui uma estrutura de domínio similar à classe PIII, mas com adição de duas subunidades de domínios tipo lectina-C ligadas por pontes de dissulfeto (JIA et al., 1997; MOURA-DA-SILVA et al., 2003; CALVETE, 2005; CALVETE et al., 2005; SERRANO et al., 2005; RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

É importante ressaltar que, moléculas não catalíticas contendo o domínio desintegrina ou tipo-desintegrina, são via de regra, um subproduto da autoproteólise das SVMPs das classes P-II e P-III. Durante esse processo ocorre a formação de intermediários com subsequente formação de moléculas com massas moleculares sucessivamente menores. Os domínios tipo-desintegrina possuem normalmente a seqüência RGD ou ECD (Arg-Gly-Asp ou Glu-Cys-Asp) que reconhecem integrinas localizadas em vários tipos de células (RAMOS & SELISTRE-DE-

ARAUJO, 2006). A ALT-C, uma metalopeptidase da classe P-III, encontrada no veneno de *B. alternatus*, contém o motivo ECD em seu domínio tipo-desintegrina através do qual, se liga à integrina  $\alpha 2\beta 1$  expressa em diferentes tipos celulares, competindo com as ligações destas com colágeno tipo I (SOUZA et al., 2000; COMINETTI et al., 2004; CALVETE, 2005).

### 1.2.2 Desintegrinas

As desintegrinas são peptídeos derivados de proteínas precursoras conhecidas como metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs) (BRIDGES et al., 2005).

As desintegrinas isoladas dos venenos de Viperidae são componentes não-enzimáticos de pequena massa molecular que contêm as seqüências adesivas de tripeptídeo RGD ou KGD (Lys-Gly-Asp). Estas desintegrinas ligam-se à integrinas das superfícies das plaquetas e inibem a agregação destas, quando induzidas por diferentes vias. Contudo, a maior parte das metalopeptidases com domínios tipo-desintegrina não possuem a seqüência RGD. Com algumas exceções, as SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas têm a seqüência conservada ECD próxima da região onde a seqüência RGD é encontrada nas desintegrinas “verdadeiras” (CALVETE et al., 2005; MAZZI et al., 2007).

A classe P-III das SVMPs são homólogas a uma família de proteínas integrais da membrana celular de vários tecidos de mamíferos denominados ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) ou MDCs (*Metalloproteinase-like Disintegrin-like Cysteine-rich*) (JIA et al., 1997, CALVETE, 2005). Os membros desta família de proteínas são assim denominados porque possuem domínios semelhantes à metalopeptidases, semelhantes à desintegrina e rico em cisteínas (SAGANE et al., 1998). As desintegrinas celulares ADAMs/MDCs são potentes reguladores de interações célula-célula e célula-matriz.

O domínio tipo-desintegrina das ADAMs se relaciona com a seqüência não-RGD das desintegrinas de veneno de serpente e algumas são conhecidas por interagir com a integrina  $\alpha 2\beta 1$  (DE LUCA et al., 1995; HERREN, 1996).

As desintegrinas podem ser classificadas em monoméricas (pequenas, médias e grandes) e diméricas (homo e hetrodiméricas), baseando-se em similaridades de seqüência, padrão de pontes de dissulfeto e relações evolucionárias (Tabela 2).



**Tabela 2.** Características de domínios desintegrina baseando-se em seqüência, padrão de pontes de dissulfeto e relações evolucionárias (Extraído de RAMOS & ELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Tipo	Cadeia	Classe	Resíduos	Pontes de dissulfeto	Distâncias evolucionárias*	Membros **
Desintegrina		Pequena	41-51	4	0,27	Echistatina, Eritostatina, Obtustatina, Ocellatusina
	Monomérica	Média	~ 70	6	0,14	Albolabrina, Barbourina, Eleganina, Flavoridina, Halisina, Kistrina, Salmosina 2, Triflavina
		Grande	~ 84	7	0,09	Bibistatina, Salmosina-3
	Dimérica	Homodimérica	~67/cadeia	4 ic / 2 bc	0,41	CC8, Contortrostatina
		Heterodimérica				EC3, EC6, EMF10, EO5, VB7, VLO4, VLO5
Tipo-desintegrina	Monomérica	-	~ 100	8	0,1	HR1A, Trimelisin-I, HF3, Botropasina, Jararagina, Catrocolastatina-C

ic: Pontes de dissulfeto intracadeia; bc: Pontes de dissulfeto entre cadeias.

\* distância evolucionária mínima estimada pelo método de *neighbor joining* (calculadas a partir de Calvete et al., 2003). Unidades arbitrárias inferidas por relógio evolutivo.

\*\* Alguns membros representantes são citados.

### 1.3 Integrinas

Integrinas são uma grande família de proteínas transmembrana que formam receptores heterodiméricos capazes de se ligar a várias proteínas da MEC, tais como: fibronectina, laminina, tenascina, trombospondina e colágeno (HEINO, 2000). São formadas por duas subunidades ou cadeias, sendo uma  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Ao se ligarem, as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  formam dímeros e possuem sítios de ligação para diversos ligantes. Nos mamíferos, são conhecidas pelo menos 24 integrinas geradas por combinações de 17 subunidades  $\alpha$  e 8 de subunidades  $\beta$ . Uma única cadeia  $\beta$  pode formar complexos diméricos com várias cadeias  $\alpha$  formando integrinas distintas que possuem diferentes especificidades por ligantes. As integrinas formam, portanto, uma família de receptores

de adesão celular que desempenham importantes funções nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular dentre elas: agregação plaquetária, reação inflamatória, remodelagem tecidual, adesão celular, migração, angiogênese além de outros processos biológicos (HUANG, 1998; CLEMETSON, 1998; LONGHURST & JENNINGS, 1998).

As associações entre integrinas e seus ligantes são frequentemente promíscuas, de forma que uma integrina pode adotar vários ligantes e um ligante pode interagir com várias integrinas (RAMOS, 2003) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Integrinas, seus ligantes endógenos e suas distribuições celulares (Extraído e modificado de RAMOS, 2005).

SUBUNIDADES	LIGANTES ENDÓGENOS	DISTRIBUIÇÃO CELULAR		
		não leucócito	leucócito	
β1	α1	CO, LM	FB, MB	actB, actT
	α2	CO, LM, CA	PT, FB, ED, EP	act
	α3	CO, LM, FN, ENT, TSP	EP, FB	
	α4	vWF	CN, FB	B, T, M, LGG
	α5	FN, FG, ADAM15, L1CAM, OP, TSP	FB, EP, ED, PT	TM, T
	α6	LM, MER, KAL, ADAM-2, ADAM-3, ADAM-9	PT	T
	α7	LM	MC, EP	
	α8	OP, VN, FN, NF, TN, OP, VCAM, ADAM-12, ADAM-15, FXIII	EP, CN	
	α9	CO, LM, TTG, vWF	Amplamente distribuída	
	α10	CO	CO, FB, MC	
	α11	CO	MC	
αV	OP, VN, FN, L1CAM, TGF-β1	FB		
β2	αL	ICAM-1, 2, 3, 4 e 5		B, T, M, G
	αM	C3bi, FG, ICAM-1, NIF		M, G
	αX	C3bi, FG		M, G
	αD	VCAM-1, ICAM-3		MMc
β3	αIIb	FG, FN, vWF, ICAM-1, TSP, CO, OP	PT, diversas células tumorais	
	αV	ADAM-15, ADAM-23, BSP, MMP-2, NF, CO, ED, OP, VN, FN, FG, vWF, PT, TSP, TN, LM, PECAM-1, L1CAM, Thy-1	ED	
β4	α6	LM	CC	
β5	αV	ADAM-9, FN, VN, BSP, PT, TGF-β1, OP	CC, FB, EP	
β6	αV	FN, NF, TSP, TGF-β1	CC, EP	
β7	α4	FN, Mad-CAM, NF		LIE
	αE	Cad-E		LIE
B8	αV	FN, VACAM-1, LM, CO, TGF-β1	EP, AT	

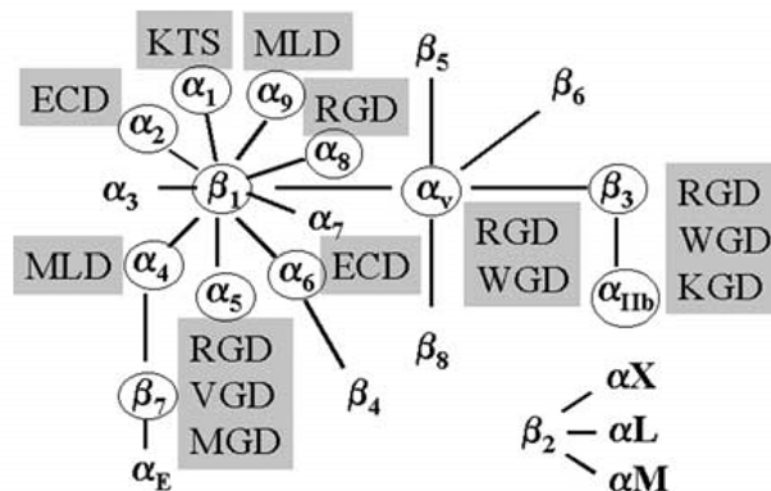
**Ligantes:** ADAM: desintegrina e metalopeptidase; BSP: sialoproteína do osso; CA: condroadarina; Cad-E: caderina E; CO: colágeno; ENT: entactina; FG: fibrinogênio; FN: fibronectina; VCAM: molécula de adesão de células vasculares; FX: fator X da coagulação; FXIII: fator XIII da coagulação; ICAM: molécula de adesão intercelular; KAL: kalinina; L1CAM: molécula de adesão de células L1; LM: laminina; MadCAM: molécula de adesão da mucosa; C3bi: proteína 3b inativada (sistema complemento); MER: merosina; NF: nefronectina; NIF: fator inibidor de neutrófilos; OP: osteopontina; PECAM-1: molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais; PT:

protrombina; TGF-  $\beta$ 1; fator de crescimento transformante  $\beta$ 1; Thy-1: antígeno 1 de célula do timo; TN: tenascina; TSP: trombospondina; TTG: transglutaminase tecidual; VN: vitronectina; vWF: fator von Willebrand.

**Células:** actB: células B ativadas; actT: células T ativadas; AT: astrócito; B: células B; CC: células de carcinoma; CN: células derivadas da crista neuronal; CO: condrócitos; ED: células endoteliais; EP: células epiteliais; FB: fibroblasto; G: granulócitos; LGG: linfócitos granulares grandes; LIE: linfócitos intraepiteliais; M: monócitos; MB: membrana basal; MC: células musculares; MMC: linhagens mielomonocíticas; PT: plaquetas; T: células T.

Ao se associarem a ligantes endógenos ou não, as integrinas podem atuar como transdutores de sinais do meio extracelular para o meio intracelular (sinalização tipo “*outside-in*”). Entretanto, o caminho inverso também é possível, onde a interação com componentes intracelulares pode modificar a afinidade desses receptores aos seus ligantes (sinalização tipo “*inside-out*”) constituindo um sistema de sinalização bidirecional entre o meio intra e extracelular (EMSLEY et al., 2000).

As desintegrinas possuem atividade agonista ou antagonista de integrinas e podem atuar em muitos processos biológicos mediados por integrinas (SOUZA et al., 2000; MONLEÓN et al., 2003; COMINETTI et al., 2004; CALVETE et al., 2005; CIDADE et al., 2006).



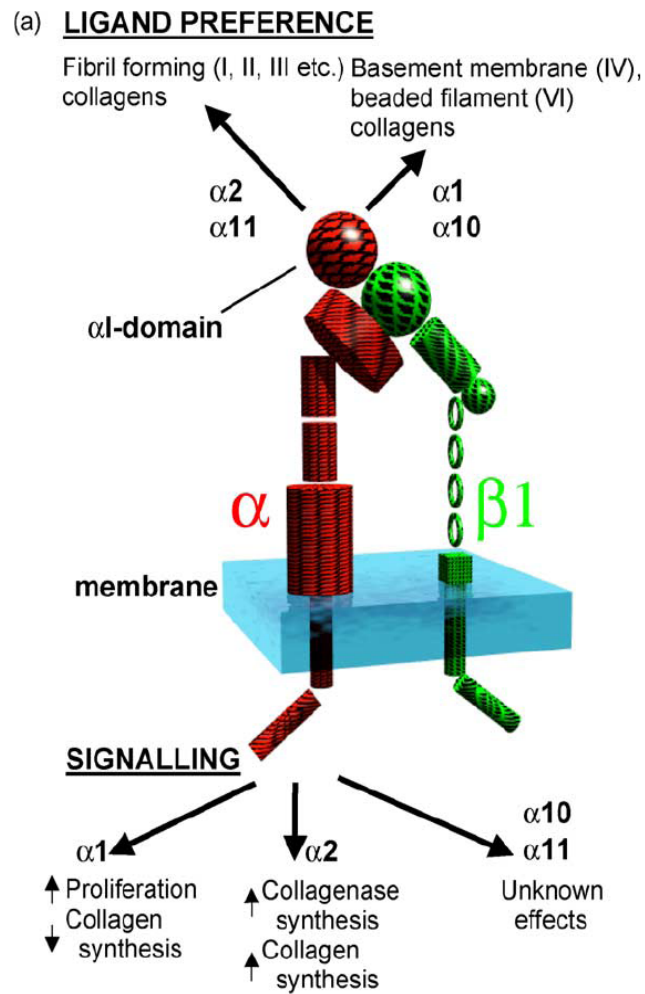
**Figura 1.** Diagrama da família das integrinas e suas interações específicas com os diferentes motivos (tripeptídeos) das desintegrinas de veneno de serpentes (Extraído e modificado de CALVETE et al., 2005).

### 1.3.1 Interação integrina-colágeno

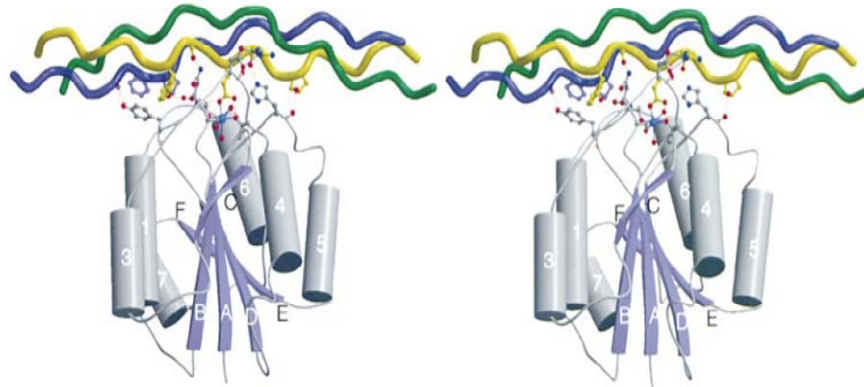
A interação colágeno-célula é um dos principais sistemas de adesão celular descritos até hoje. As integrinas receptoras de colágeno são estruturalmente distintas das integrinas que se ligam a outras moléculas da MEC. Elas possuem um domínio I específico inserido na subunidade  $\alpha$  e é esse domínio que reconhece o colágeno em uma ligação dependente de  $Mg^{+2}$  (HEINO, 2000; CONNORS et al., 2007). Nos vertebrados, são conhecidas quatro diferentes integrinas que compõem um subgrupo que contém o domínio  $\alpha I$ :  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  e  $\alpha 11\beta 1$  (Figura 3 e 4). Este subgrupo são os principais de ligantes de colágeno quando comparados a outras integrinas. A integrina  $\alpha 1\beta 1$  é abundante na fibra muscular lisa e a integrina  $\alpha 2\beta 1$  é considerada o principal receptor de colágeno nas plaquetas e células epiteliais. Muitos tipos celulares incluindo fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, células endoteliais e linfócitos podem expressar ambos os receptores simultaneamente. A integrina  $\alpha 10\beta 1$  é um receptor de colágeno tipo II nos condrócitos e estudos sugerem que a integrina  $\alpha 11\beta 1$  participa do metabolismo ósseo e cartilaginoso (HEINO, 2000; EMSLEY et al., 2004; WHITE et al., 2004; CONNORS et al., 2007; POPOVA et al., 2007).

Ensaio *in vitro* demonstraram que a interação integrina-colágeno participa de inúmeros processos biológicos, tais como: adesão e migração celular, controle da síntese de colágeno, síntese de metalopeptidases de matriz, remodelagem de matriz colagenosa, e ainda influencia complexos processos de proliferação e diferenciação celular, angiogênese, adesão/agregação plaquetária e tubulogênese endotelial (HEINO, 2000; RAMOS et al., 2007; GULLBERG & LUNDGREN-AKERLUND, 2002; SHIMAOKA, et al., 2002; COMINETTI et al., 2004; HOLLENBECK et al., 2004).

Estudos *in vivo* também demonstram que as interações colágeno-célula atuam na reorganização da matriz de colágeno nos tendões, ligamentos, periósteo, cápsula de órgãos, angiogênese e na regeneração tecidual (GULLBERG & LUNDGREN-AKERLUND, 2002; WHITE et al., 2004; SHIMAOKA et al., 2002, GRENACHE et al., 2007; RAMOS et al., 2007).



**Figura 2.** Integrinas que se ligam preferencialmente ao colágeno. O domínio  $\alpha I$  se liga ao colágeno, sendo que, as fibrilas de colágeno (colágeno I, II, III, etc.) se ligam preferencialmente aos domínios  $\alpha 2I$  e  $\alpha 11I$ ; a membrana basal (colágeno IV) e os filamentos de colágeno (colágeno VI) se ligam aos domínios  $\alpha 1I$  e  $\alpha 10I$ . Quando o colágeno é reconhecido pela integrina, cauda citoplasmática sofre uma mudança conformacional que induz respostas intracelulares (adaptado de WHITE et al., 2004).

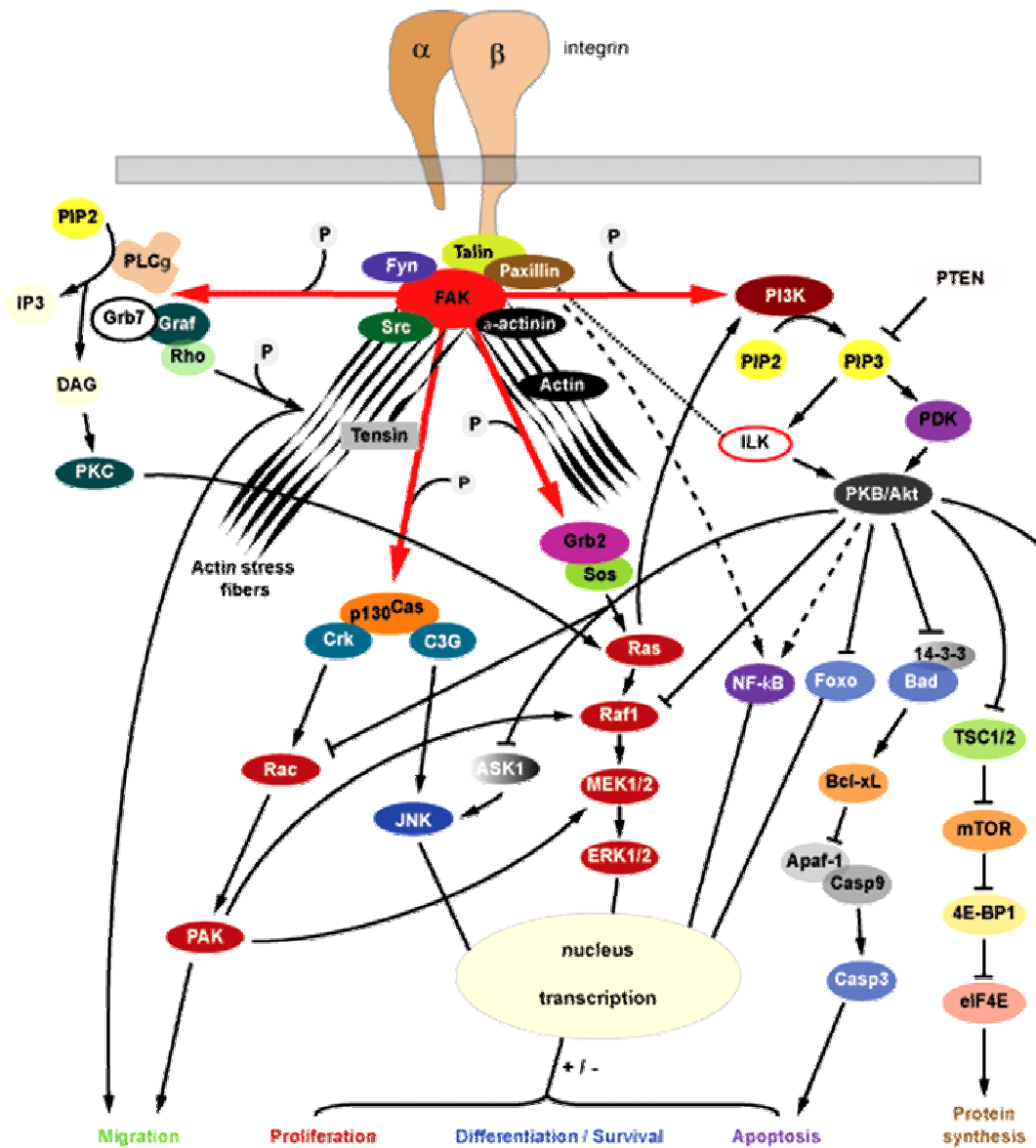


**Figura 3.** Diagrama estrutural do complexo domínio I-colágeno da integrina  $\alpha 2\beta 1$ . As hélices do domínio I são representadas por cilindros. A tripla hélice da molécula de colágeno é formada por três cadeias de aminoácidos, representadas em verde, amarelo e azul (modificado de EMSLEY et al., 2000).

### 1.3.2 Sinalização intracelular via integrina

O principal modo de sinalização por integrina ocorre por meio da interação com quinases intracelulares que interagem diretamente ou indiretamente com a subunidade  $\beta$  ou via proteínas adaptadoras ligadas à subunidade  $\alpha$  das integrinas. A tirosina quinase de adesão focal (FAK) tem sido foco de muitos estudos. A FAK interage indiretamente com a subunidade  $\beta$  da integrina via paxilina e talina. Outra via conhecida é a serina/treonina quinase (ILK) que interage com as integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  (DEDHAR et al., 1999; GULLBERG & LUNDGREN-AKERLUND, 2002; SHIMAOKA et al., 2002).

Estudos revelam interações (*crosstalk*) entre as integrinas, os receptores de fatores de crescimento celular e os componentes da MEC e demonstram que a ativação de vias de sinalização intracelular mediadas pelas integrinas/receptor de fator de crescimento pode ser sinérgica em processos que envolvem diferenciação, crescimento e adesão celular em vários tipos celulares (ELICEIRI, 2001).



**Figura 4.** Representação esquemática da cascata de sinalização intracelular ativada por contato focal mediado por integrinas. O elemento-chave desta via é a FAK que é ativada por auto-fosforilação da Y<sup>397</sup>, por meio de ligação com a Src e Fyn promovendo outras fosforilações resultando nos efeitos decorrentes da modulação das vias. A fosforilação da FAK induz por vias específicas e suas subseqüentes interações com outras proteínas como, por exemplo, Grb2, p130<sup>Cas</sup>, PI3K, Graf, que disparam cascatas de eventos que podem induzir proliferação celular, migração ou sobrevivência. A FAK também pode ser ativada por receptores de superfície de célula para fatores de crescimento, hormônios e citocinas. As linhas contínuas indicam a ativação ou inibição direta. As linhas tracejadas indicam interação funcional indireta. A linha vermelha indica eventos FAK-mediados específicos que envolvem fosforilação. Fonte: [http://www.chuv.ch/cpo\\_research/](http://www.chuv.ch/cpo_research/), acessado em 03/12/2007.

#### 1. 4 Alternagina, Alternagina-C e peptídeo derivado da Alternagina-C

Tanto os venenos de serpentes quanto o isolamento e a caracterização de seus componentes têm sido alvo de intensas pesquisas científicas. Dentre as substâncias presentes nos venenos destacam-se aquelas que possuem tanto efeitos tóxicos quanto efeitos terapêuticos, ou seja, são de interesse médico e farmacológico.

Souza et al. (2000) isolaram e caracterizaram estruturalmente no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, uma metalopeptidase derivada do veneno bruto de *B. alternatus*. Essa proteína com massa molecular de 55 kDa foi denominada Alternagina e, através do processamento proteolítico da Alternagina derivou-se um fragmento de menor massa molecular (29 kDa), que foi denominado Alternagina-C (ALT-C). A ALT-C apresenta os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas. O domínio tipo-desintegrina, inclui a seqüência adesiva ECD, alternativamente àquela encontrada em desintegrinas RGD. Baseando-se na seqüência parcial da ALT-C, foi projetado e obtido um peptídeo cíclico sintético (GRASMSEÇDPAEH-NH<sub>2</sub>) que apresenta a seqüência interna adesiva ECD (ALT-C PEP). Ambos, ALT-C e o peptídeo derivado de sua estrutura foram patenteados no Brasil sob o registro PI0501233-3 no Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Tanto a ALT-C quanto o ALT-C PEP se ligam à integrina  $\alpha 2\beta 1$  e podem interferir com as ligações entre o colágeno tipo I e a integrina  $\alpha 2\beta 1$ , expressa em diferentes tipos celulares como células endoteliais e plaquetas (HEINO, 2000; SOUZA et al., 2000; COMINETTI et al., 2004; CALVETE, 2005).

Estudos prévios *in vitro* demonstram que a ALT-C e o ALT-C PEP modulam a quimiotaxia de neutrófilos humanos via sinalização mediada por integrina e que estes efeitos estão relacionados ao motivo ECD presente no domínio tipo-desintegrina (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003).

Cominetti et al. (2004) demonstraram que a ALT-C inibe a adesão de fibroblastos de camundongo ao colágeno tipo I (NIH-3T3) e essa inibição é dependente da concentração. Estes autores verificaram que a ALT-C estimula a adesão e proliferação de células endoteliais (HUVEC) em cultura, induz a expressão de VEGF em fibroblastos humanos e a fosforilação da via Akt/PKB em HUVECs, sugerindo que pode ser este o mecanismo pelo qual a ALT-C induz a diferenciação e proliferação de células endoteliais.



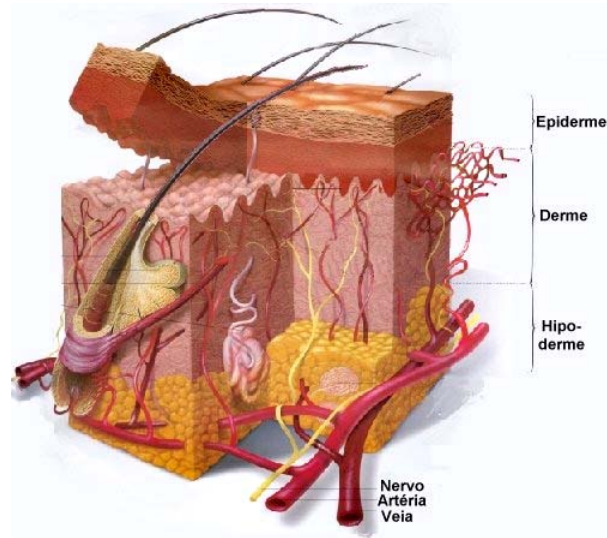
Posteriormente, Ramos et al. (2007) demonstraram que a ALT-C, em diferentes concentrações, aumenta a expressão gênica do receptor de VEGF tipo 2 (VEGF2/KDR), mas não de VEGFR1 (Flt1) em HUVEC. Os autores verificaram também que, ambos, ALT-C e ALT-C PEP modulam a migração de células endoteliais e angiogênese, quando comparados ao controle (FGF-2), em modelo usando matrigel implantado no tecido subcutâneo abdominal de camundongos. Descrevem ainda que o ALT-C PEP afeta a proliferação de HUVECs em cultura.

### **1. 5 Pele: estrutura, lesão e cicatrização**

A função primária da pele é atuar como barreira protetora contra agentes externos e sua integridade é essencial para a manutenção da homeostasia tecidual. A quebra da sua integridade confere ao indivíduo vulnerabilidade a uma gama de condições patológicas tais como: infecções, perda de fluidos corporais e desequilíbrio eletrolítico (SINGER & CLARK, 1999; BAUM & ARPEY, 2005).

#### **1. 5. 1 Estrutura histológica da pele**

A pele consiste em diferentes tecidos que se juntam para realizar funções específicas. Estruturalmente, a pele possui duas partes principais. Uma parte superficial, mais fina composta de tecido epitelial, denominada epiderme e, imediatamente abaixo, se localiza a derme, composta de tecido conjuntivo denso envolto por matriz extracelular. Subjacente à pele encontra-se a camada subcutânea ou hipoderme composta de tecido conjuntivo areolar e adiposo e contém vasos sanguíneos que suprem a pele (Figura 5). Com o rompimento da integridade ou continuidade da pele nos animais vertebrados, logo se inicia o processo de reparo, que restaura sua estrutura normal ou próxima do normal (EDMONDSON et al., 2003).



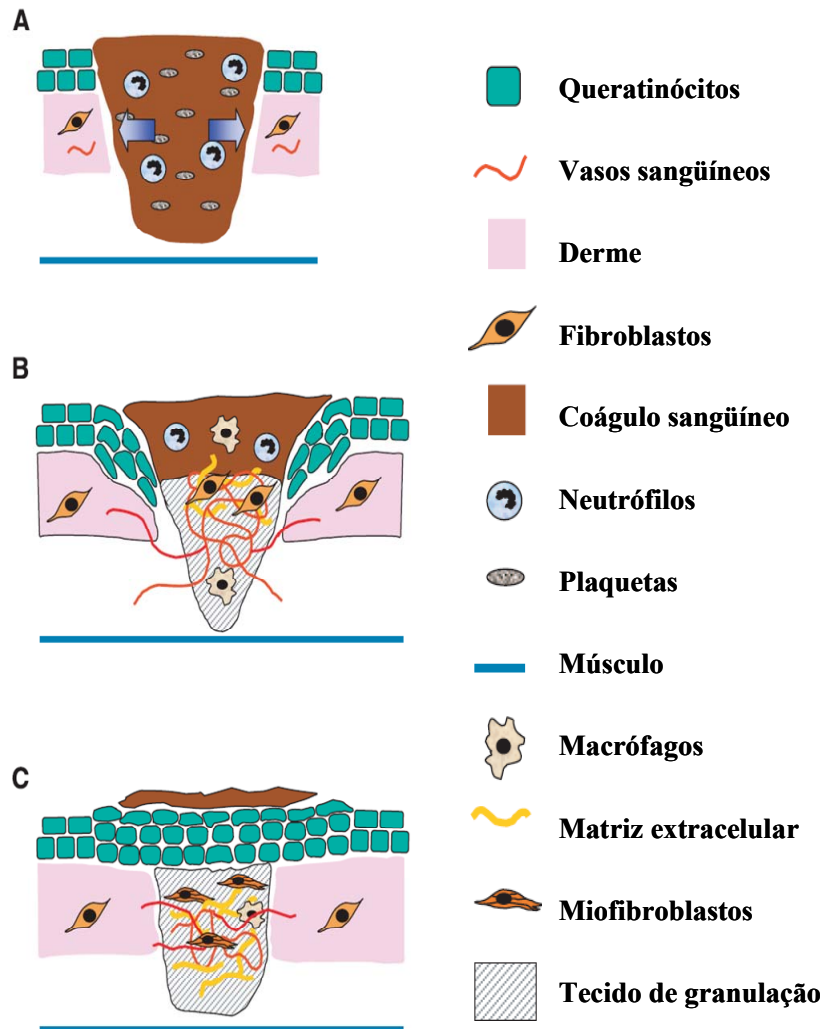
**Figura 5.** Representação esquemática das camadas da pele. A camada mais externa é denominada epiderme. Imediatamente abaixo, se localiza a derme. Subjacente à pele encontra-se a camada subcutânea ou hipoderme composta de tecido conjuntivo areolar e adiposo e contém vasos sanguíneos que suprem a pele.

### 1. 5. 2 Lesão cortante/incisiva na pele

As lesões de pele têm sido usadas como modelo para elucidar o processo biológico envolvido na cicatrização de feridas e regeneração tecidual (STADELMANN et al., 1998). Neste sentido, muito se tem estudado a respeito do complexo processo de reparo de feridas, onde estão envolvidas células, sinais químicos e matriz extracelular que em conjunto, conduzem à cicatrização. Assim sendo, inúmeras pesquisas têm sido realizadas no sentido de se identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo. A busca de substâncias com atividade angiogênica têm sido intensa, pelo seu grande potencial de aplicação clínica.

O reparo normal dos tecidos consiste em um processo complexo, envolvendo intrincadas interações de diferentes tipos de células, proteínas estruturais, fatores de crescimento e proteinases. A progressão ordenada de cicatrização dos tecidos define as fases de hemostasia, inflamação, síntese e deposição de matriz, formação de tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem. (STADELMANN et al., 1998; LI et al., 2007). Geralmente divide-se o processo normal de regeneração em 3 fases, que se sobrepõem de forma contínua e temporal: inflamação, proliferação e remodelagem, os quais ocorrem numa

seqüência de eventos bioquímicos e celulares (Figura 6) (MARTIN, 1997; STADELMANN et al., 1998; BAUM & ARPEY, 2005; BROUGHTON II et al., 2006; LI et al., 2007).



**Figura 6.** Representação esquemática dos diferentes estágios do reparo tecidual. **A**, 12 a 24 horas após a lesão, toda a área lesada aparece preenchida por um coágulo sanguíneo. Neutrófilos invadem o local. **B**, 3 a 7 dias após a lesão, a maioria dos neutrófilos já sofreram apoptose, entretanto os macrófagos são abundantes no local da lesão neste estágio da lesão. As células endoteliais migram para o coágulo, se proliferam e formam novos vasos sanguíneos enquanto que, os fibroblastos migram para o local da lesão, se proliferam e depositam matriz extracelular e colágeno. Um novo tecido é formado e denominado tecido de granulação. Os queratinócitos se proliferam e migram das bordas da lesão em direção ao centro, sobre a derme formada por uma matriz provisória. **C**, 1-2 semanas após a lesão, o local é completamente preenchido por tecido de granulação, fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos que contraem o tecido neoformado diminuindo o diâmetro da lesão. O local lesado é completamente recoberto por uma nova epiderme (Extraído e modificado de WERNER & GROSE, 2003).

### **1.5.3 Cicatrização da pele**

#### **1.5.3.1 Fase inflamatória: hemostasia e inflamação**

A hemostasia ocorre imediatamente após a lesão. Compõe-se de uma série de eventos essenciais para impedir a perda sanguínea e serve de arcabouço estrutural para as etapas subseqüentes que culminam com a cicatrização do tecido. A lesão endotelial promove vasoconstrição, ativação da coagulação e agregação das plaquetas próximas à área lesada iniciando a cascata de coagulação. O coágulo formado é composto de colágeno proveniente da borda da lesão, trombina, fibrina, fibronectina e por plaquetas que liberam citocinas e fatores de crescimento que disparam a resposta inflamatória (WERNER & GROSE, 2003; BROUGHTON II et al., 2006).

Macroscopicamente a inflamação é manifestada por eritema, calor, edema e dor que resultam da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular causados pela liberação de substâncias vasoativas pelos mastócitos como a histamina que induz a produção de prostaglandinas e leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> (BAUM & ARPEY, 2005).

A resposta celular da fase inflamatória se caracteriza pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares circulantes ao local da lesão, sendo os neutrófilos e os monócitos as células predominantes, seguido pelos linfócitos (BAUM & ARPEY, 2005; LI et al., 2007). Os neutrófilos e os monócitos são recrutados para o local da lesão por fatores quimiotáticos liberados durante a hemostasia e também por mastócitos. Esses fatores são produzidos durante o processo de coagulação e dentre eles estão a calicreína, fibrinopeptídeos liberados do fibrinogênio pela trombina e produtos da degradação da fibrina que também atuam como estímulo para a expressão de importantes moléculas de adesão celular. Os neutrófilos chegam ao local da lesão após alguns minutos. Uma vez ativados, fagocitam os tecidos necróticos e microorganismos, degradando-os pela liberação de espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossomais, que incluem proteases neutras, collagenases e elastases (MARTIN, 1997; BROUGHTON II et al., 2006).

No local da lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos e juntamente com os macrófagos teciduais completam o desbridamento iniciado pelos neutrófilos, digerem e matam organismos patogênicos e destroem os neutrófilos remanescentes (MARTIN, 1997; BROUGHTON II et al., 2006). Os macrófagos ainda liberam fatores quimiotáticos que atraem

fibroblastos para a área da lesão e fatores de crescimento: derivado das plaquetas (PDGF), endotelial (VEGF), dos fibroblastos (FGF) e os transformantes  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ ). Os macrófagos parecem atuar como pivô na transição da fase inflamatória para a proliferativa (LI et al., 2007).

### **1.5.3.2 Fase proliferativa: epitelização, angiogênese e formação de matriz extracelular provisória**

Aproximadamente 4 dias após a lesão, uma MEC provisória se forma e recebe o nome de tecido de granulação. O tecido de granulação ainda contém macrófagos que produzem citocinas e fatores de crescimento necessários para estimular a fibroplasia e a angiogênese. Os fibroblastos produzem mais MEC para sustentar as células em crescimento e novos vasos são formados para suprir tecido neoformado de oxigênio e nutrientes, necessários para a manutenção do metabolismo celular (SINGER & CLARK, 1999; LI et al., 2007).

O aumento na população de fibroblastos nesta matriz extracelular provisória é consequência do influxo migratório e da proliferação celular. Alguns fatores de crescimento como PDGF e TGF $\beta$  induzem a migração celular e outros fatores como FGF e IGF-1 induzem mitose dos fibroblastos (BAUM & ARPEY, 2005). Os fibroblastos perpetuam o processo de formação de matriz extracelular por estimulação autócrina e parácrina de PDGF adicional (BROUGHTON II et al., 2006).

Na pele normal, cerca de 80-90% do colágeno é do tipo I, o restante se compõe, normalmente, de colágeno tipo III. Contudo, no tecido em reparo, essa proporção se diferencia e o colágeno tipo III aumenta cerca de 30%. O colágeno tipo III começa a ser depositado 48 a 72 h e seu pico de secreção e/ou deposição ocorre entre 5 e 7 dias após a lesão. O colágeno atua no tecido em reparo, promovendo resistência e facilitando o movimento de células como as endoteliais e os macrófagos (STADELMANN et al., 1998; BAUM & ARPEY, 2005, LI et al., 2007).

As células epiteliais da pele, localizadas nas bordas da lesão e ao redor dos apêndices (foliculos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas), proliferam e emitem projeções para restabelecer a barreira protetora contra agentes nocivos. O estímulo para a quimiotaxia e proliferação das células epiteliais acontece pela liberação de citocinas inflamatórias e fatores de

crescimento (EGF e  $TGF\alpha$ ) produzidos por plaquetas e macrófagos. Além disso, fibroblastos sintetizam e secretam o fator de crescimento do queratinócito (KGF-1 e KGF-2), que por sua vez, estimula a migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos (BROUGHTON II et al., 2006). A expressão de integrinas nas células da epiderme, as quais interagem com muitas proteínas da MEC, permite a migração destas (SINGER & CLARK, 1999). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, influenciada pelo  $TGF\beta$ , induz no fibroblasto a expressão de actina e miosina que produzem a contração mecânica da lesão diminuindo sua extensão (BROUGHTON II et al., 2006).

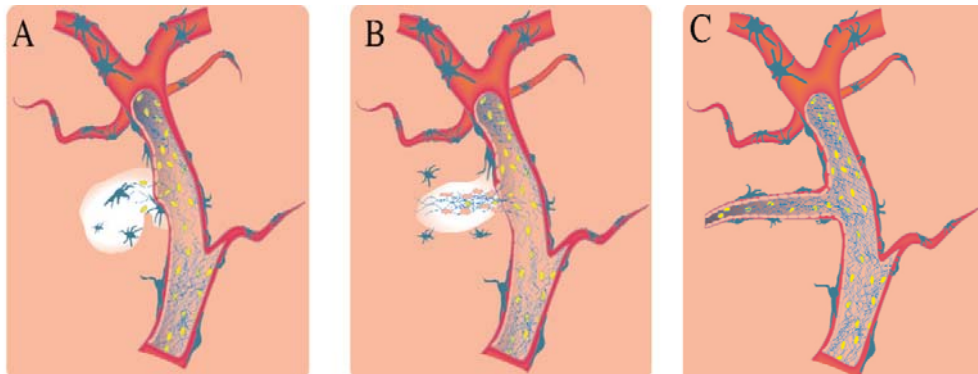
### **1.5.3.3 Maturação e remodelagem**

Clinicamente, a maturação e a remodelagem são fases muito importantes, que ocorrem entre 8 dias até 2 anos após a lesão. A remodelagem depende de lentas e contínuas, síntese e degradação de colágeno (SINGER & CLARK, 1999). O colágeno tipo III formado no tecido de granulação é gradualmente degradado e o colágeno tipo I tem sua síntese aumentada. A degradação do colágeno é controlada por várias MMPs secretadas por macrófagos, células epidérmicas, células endoteliais e em maior quantidade pelos fibroblastos. Nas várias fases do reparo tecidual, atuam combinações distintas de MMPs e TIMPs (SINGER & CLARK, 1999; BROUGHTON II et al., 2006; LI et al, 2007).

O colágeno depositado no local da lesão, provavelmente, não terá a mesma organização original de um tecido íntegro. Mesmo após 1 ano de maturação, a resistência à tração não atinge os 100%, relativo ao tecido íntegro. Após 1 semana, o local lesado possui apenas 3% de resistência, com 3 semanas 30% e aos 3 meses após a lesão, atinge aproximadamente 80% de resistência à tração (SINGER & CLARK, 1999; BROUGHTON II et al., 2006; LI et al, 2007).

## 1.6 Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos, importante tanto em condições fisiológicas, quanto em condições patológicas. A angiogênese ocorre naturalmente no organismo durante o desenvolvimento embrionário e é essencial para restabelecer o suprimento de oxigênio e nutrientes durante a cicatrização de tecidos (CONWAY et al., 2001; BAUER et al., 2005). Nas fêmeas, a angiogênese ocorre também durante o ciclo reprodutivo mensal (para a reconstrução da camada uterina interna e maturação do oócito durante a ovulação) e para a formação da placenta, durante a gravidez (Figura 7) (TONINI et al., 2003).



**Figura 7.** Fases da angiogênese fisiológica. **A**, degradação da matriz extracelular por metaloproteínases de matriz e subsequente desagregação dos pericitos; **B**, proliferação e migração de células endoteliais na matriz extracelular provisória; **C**, formação tubular do capilar (Extraído e modificado de RUNDHAUG, 2005).

O controle da angiogênese ocorre por meio da regulação de fatores pró e anti-angiogênicos no organismo. Em condições normais, o organismo é capaz de manter um perfeito equilíbrio entre os moduladores angiogênicos. Nos casos em que o organismo perde o controle sobre a formação de novos vasos sanguíneos, surgem estados patológicos, nos quais a angiogênese pode ser excessiva ou insuficiente (TONINI et al., 2003). A angiogênese excessiva ocorre em doenças como: câncer, retinopatia diabética, doenças inflamatórias crônicas, psoríase e em várias outras condições. Nestes casos, os novos vasos sanguíneos alimentam os tecidos doentes. Quando a angiogênese é insuficiente podem ocorrer doenças coronarianas, retardo na cicatrização de ferimentos e derrame cerebral. Nestas condições, o crescimento dos vasos sanguíneos é inadequado, o que afeta a circulação sanguínea local e invariavelmente leva ao risco de morte tecidual por necrose. A angiogênese insuficiente ocorre quando os tecidos não são

capazes de produzir quantidades adequadas de fatores angiogênicos de crescimento (SWEENEY et al., 2003; TONINI et al., 2003).

A angiogênese requer uma ação coordenada de uma variedade de fatores de crescimento e de moléculas de adesão celular e se caracteriza pela formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (SINGER & CLARK, 1999; CONWAY et al., 2001; FERRARA & KERBEL, 2005).

### **1.7 Fatores de crescimento**

Os fatores de crescimento são mediadores constitutivos que atuam nas células e modulam o reparo tecidual por estimular a produção de proteínas, a síntese e a renovação da MEC. Os fatores de crescimento podem afetar a função celular por ação endócrina, parácrina, autócrina e intrácrina. Os fatores de crescimento ligam-se a receptores (glicoproteínas transmembrana) e atuam geralmente, ativando a autofosforilação intrínseca tirosino-quinase do receptor no domínio citosólico e subseqüentes reações fosforilativas intracelulares (BROUGHTON II et al., 2006).

Dentre os fatores de crescimento amplamente conhecidos estão o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), o FGF (fator de crescimento do fibroblasto), o TGF $\beta$  (fator transformante de crescimento  $\beta$ ), o EGF (fator de crescimento da epiderme), o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e o VEGF (fator de crescimento endotelial) (WERNER & GROSE, 2003).

A família PDGF consiste em quatro isoformas: (PDGF A-D) e dois receptores, PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ , que atuam em células de origem mesodérmica e células derivadas da glia. Todas as isoformas PDGF formam homodímeros, mas PDGFA e PDGFB também formam um heterodímero (AB) (BROUGHTON II et al., 2006; SHIH & HOLLAND, 2006). O PDGF foi primeiramente conhecido por ser secretado por plaquetas. Hoje, sabe-se que também é secretado por diferentes tipos de células que incluem macrófagos, monócitos, fibroblastos, fibras musculares lisas e células endoteliais. Sua liberação resulta em quimiotaxia, proliferação e modula a expressão gênica em todas estas células. Nos fibroblastos, por exemplo, estimula a proliferação e a sua migração pelo espaço intercelular para o local da lesão, induz ainda a



expressão de receptores de integrina apropriados (SINGER & CLARK, 1999; WERNER & GROSE, 2003; BROUGHTON II et al., 2006).

Os FGFs são uma família de fatores de crescimento pleiotrópicos que, até o presente, se compõem de vinte e dois membros. Dentre estes, as isoformas heparino-ligantes, o FGF-1 (aFGF/FGF ácido) e o FGF-2 (bFGF/FGF básico) foram identificadas, purificadas e seqüenciadas (ZAKRZEWSKA et al., 2004; PRESTA et al., 2005). O FGF-1 é um dos fatores de crescimento melhor estudado. É um poderoso mitógeno e está envolvido com estímulos à síntese de DNA e proliferação de uma grande variedade de células que incluem fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, fibras musculares lisas, mioblastos, condrócitos e células da glia. Participa de processos que envolvem reparo tecidual e angiogênese (ZAKRZEWSKA et al., 2004; PRESTA et al., 2005). Podem se ligar a quatro receptores de membrana Tyr-cinase (FGFR 1-4) com potenciais diferentes de afinidade (WERNER & GROSE, 2003).

O TGF $\beta$  é uma citocina multifuncional envolvida na regulação da proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência de vários tipos celulares. Três isoformas estão presentes nos mamíferos (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3), cada um com funções distintas. A ação do TGF $\beta$  é altamente dependente do contexto celular. É secretado na forma latente e precisa ser ativado por proteases, trombospondinas ou por ligação a determinadas integrinas, antes de se ligar ao receptor específico (Tipo I e II Ser-Tre/quinase) (GOUMANS et al., 2003; LEBRIN et al., 2005; WIPFF & HINZ, 2008; JENKINS, 2008). O TGF $\beta$  atua no reparo tecidual por promover a migração de fibroblastos e células endoteliais. Induz a deposição de MEC, a secreção de colágeno tipo I, inibe a síntese de TIMPs e aumenta a produção de proteínas de adesão celular pelos fibroblastos, durante a formação do tecido de granulação (BROUGHTON II et al., 2006; LI et al., 2007). Estimula a expressão de FGF e PDGF pelos monócitos e também induz a contração dos miofibroblastos, promovendo o fechamento da lesão (BROUGHTON II et al., 2006).

O TGF $\alpha$ , membro da superfamília de citocinas EGF (fator de crescimento da epiderme), é produzido por macrófagos ativados, plaquetas, queratinócitos e outros tipos celulares. TGF $\alpha$  apresenta seqüência de aminoácidos 30% homóloga ao EGF e ambos se ligam aos receptores EGF (EGFR) densamente localizados nas células endoteliais, fibroblastos e fibras musculares lisas. Possui ação pleiotrópica, estimula a motilidade, o crescimento e a proliferação de células epiteliais e endoteliais (BROUGHTON II et al., 2006; ELLIS et al., 2006).

O IGF-1, também conhecido como somatomedina C, é sintetizado por vários tecidos incluindo: fígado, coração, pulmões, rins, pâncreas, cartilagem, cérebro e músculos. A síntese do IGF-I é estimulada pelo hormônio de crescimento (GH), especialmente no fígado e se distribui pelos tecidos, por meio da circulação sanguínea, ligado a proteínas plasmáticas. O IGF-1 é liberado no local da lesão por plaquetas, fibroblastos e células epiteliais. É um potente agente quimiotático para as células endoteliais resultando em neovascularização, estímulo da formação de tecido de granulação e da reepitelização (SINGER & CLARK, 1999; BROUGHTON II et al., 2006).

Um dos fatores de crescimento mais estudados e um dos mais potentes fatores pró-angiogênicos é o VEGF (XIE et al., 2004; TAMMELA et al., 2005; LEE et al., 2006). Nos mamíferos, a família VEGF consiste em cinco membros (VEGF A-D e o PlGF - fator de crescimento placentário). O membro dessa família de VEGF mais extensivamente estudado até o momento constitui-se o VEGF-A, que representa uma proteína de aproximadamente 40 kDa envolvida no aumento da permeabilidade vascular e na angiogênese. VEGF-A age em vários componentes da angiogênese como proliferação e migração de células endoteliais, mecanismo de sobrevivência e migração celular endotelial, e o aumento da permeabilidade vascular. Há até o presente seis isoformas conhecidas de VEGF-A em humanos: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> (RODRIGUES et al., 2006). Os VEGFs, incluindo as isoformas do VEGF-A, podem interagir com três subtipos de receptores Tyr-quinases, conhecidos como VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4) presentes na membrana das células endoteliais. Uma vez ativados, estes receptores disparam cascatas de sinalização intracelulares via PI3K/Akt, Ras/Raf- MEK/Erk, eNOS/NO e IP3/Ca<sup>2+</sup>. O VEGF induz a proliferação, brotamento, migração e a formação tubular de células endoteliais, que resultam na formação de artérias, veias e vasos linfáticos (FERRARA, 2004; TAMMELA et al., 2005; KOWANETZ & FERRARA, 2006). Pesquisas indicam haver uma similaridade funcional nas repostas ativadas pela ligação VEGF/VEGFR e o sistema matriz extracelular/integrinas durante a angiogênese. Mecanismos de comunicação direta entre o VEGF e as integrinas não estão claramente definidos, mas parecem refletir uma convergência de sinalização intracelular (SENGER et al., 2002; FERRARA, 2004; KOWANETZ & FERRARA, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo verificar se ambos, ALT-C e ALT-C PEP apresentavam atividade angiogênica em modelo de lesão de pele.

Os objetivos específicos foram:

- Quantificar as diferenças morfológicas promovidas pela ALT-C e ALT-C PEP;
- Avaliar o potencial angiogênico da ALT-C e do ALT-C PEP;
- Analisar o efeito da ALT-C e do ALT-C PEP sobre síntese de colágeno tipo I;
- Verificar o efeito da ALT-C e do ALT-C PEP sobre a expressão de fatores de crescimento celular.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da ALT-C e do ALT-c PEP

A Alternagina-C (ALT-C) foi obtida através do processamento, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar, do veneno bruto de *Bothrops alternatus* cedido pelo Instituto Butantan, conforme descrito por Souza et al. (2000). O peptídeo cíclico ALT-C PEP, correspondendo à seqüência interna da ALT-C (CRASMSECDPAEH-NH<sub>2</sub>), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Clóvis Ryuichi Nakaie, do Departamento de Biofísica, UNIFESP-EPM.

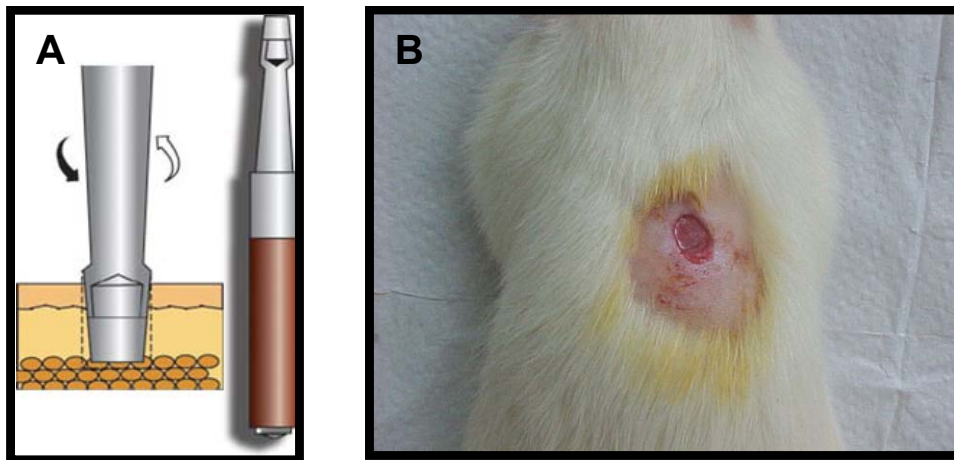
A ALT-C e o ALT-C PEP, em diferentes concentrações, foram dissolvidos em gel de natrosol® (hidroxietilcelulose) 1,5%, no momento do uso.

#### 3.2 Modelo experimental

Para o trabalho experimental foram utilizados 140 ratos albinos machos Wistar com peso corporal de 270±20g e cerca de 100 dias de vida. Os animais foram provenientes do Biotério da UNIFAL-MG (Universidade Federal de Alfenas) e foram mantidos em caixas de polietileno em ambiente higienizado, com água e ração comercial à vontade e iluminação com ciclos de 12 h claro/escuro.

#### 3.3 Procedimento cirúrgico

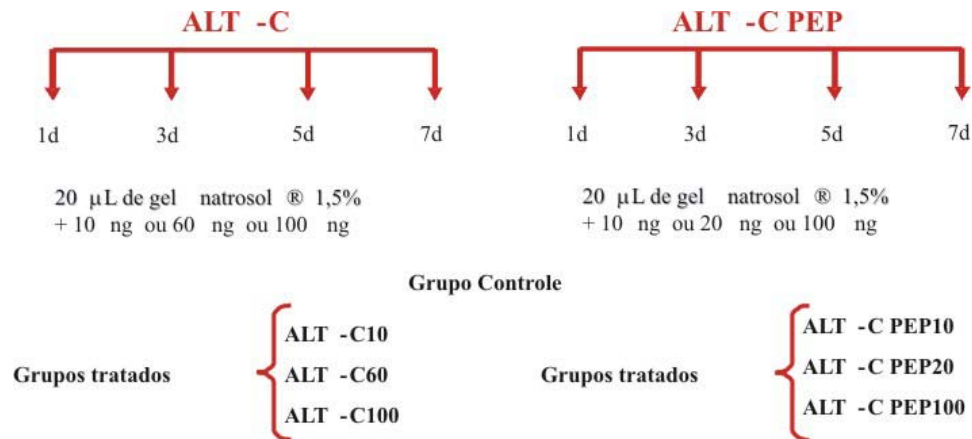
Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina. (1:1; 0,2 mL/100g, i.p.). A pele do dorso, entre as escápulas, foi tricotomizada, feita assepsia e em seguida foi induzida uma lesão esférica com um *punch* ( $\varnothing = 4$  mm), sendo removidas a epiderme e o tecido subcutâneo até a fáscia que reveste a camada muscular (Figura 8A e 8B) (GOUVÊA & SILVA JÚNIOR, 1999).



**Figura 8.** A, esquema representativo do *punch* ou vazador, utilizado como instrumento para promover a lesão neste modelo experimental. O *punch* é formado por uma lâmina circular na extremidade de um tubo que permite a remoção de um cilindro constituído por epiderme, derme e eventualmente pequena porção de hipoderme; B, modelo de lesão cutânea promovida por *punch* (4 mm de diâmetro) em pele de dorso de rato.

### 3.4 Grupos experimentais e tratamento

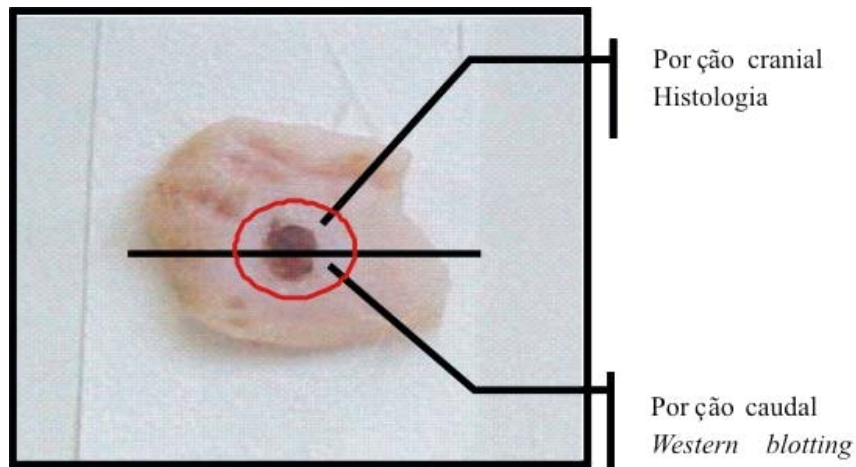
Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais com cinco animais cada: CONTROLE, ALT-C10, ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP10, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100, que foram tratados com 20  $\mu$ L de: gel (Natrozol  $\text{\textcircled{R}}$  1,5%), gel contendo 10, 60, 100 ng de ALT-C, 10, 20 e 100 ng de ALT-C PEP respectivamente. O tratamento iniciou-se imediatamente após a indução da lesão e realizou-se nos dias consecutivos, sempre no mesmo horário, de acordo com cada tempo estudado: por 1, 3, 5 e 7 dias (Figura 9).



**Figura 9.** Diagrama dos grupos experimentais: grupos CONTROLLE e grupos tratados com ALT-C ou com ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias consecutivos.

Decorrido o tempo de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia e foi removido o fragmento de pele lesada com uma borda de 2 mm ao redor da lesão. Esse fragmento foi dividido ao meio, a porção cranial foi usada para análise histológica e a porção caudal para a extração de proteínas (Figura 10).

A porção cranial dos fragmentos de pele removidos foram fixados em solução contendo paraformaldeído tamponado com cloreto de sódio a 4% (p/v), durante 12 h. A seguir o fragmento de pele foi tecnicamente processado com inclusão em parafina e feita a microtomia transversal com 5 µm de espessura. Os cortes foram divididos em 2 grupos: corados com com hematoxilina-eosina, para análise do infiltrado inflamatório e corados com picrossírius-hematoxilina, para quantificação de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979).



**Figura 10.** Fragmento de pele de rato lesada. A borda externa ao círculo vermelho foi rebatida. O fragmento foi dividido ao meio, a porção cranial foi destinada para análise histológica e a caudal para *Western blotting*.

### 3.5 Análise histológica

Foram determinadas as densidades de fibroblastos, infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), vasos sanguíneos e colágeno por morfometria em área teste de 0,0625 mm<sup>2</sup>. Utilizou-se um sistema de análise de imagem por vídeo-microscopia, com auxílio de microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo e a um monitor. Foram analisados 15 campos microscópicos aleatórios para cada grupo experimental (MELO et al., 2005).

### 3.6 Extração de proteínas

Fragments de tecido foram pesados, homogeneizados em homogeneizador de tecidos em 3 volumes de tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, contendo sacarose 250 mM, KCl 30 mM, EDTA 5 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM e antipaina 50 µM (HASTEN et al., 1998). A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000xg, por 15 min e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. As proteínas foram precipitadas durante 12 h com acetona gelada a -18°C. A seguir as amostras foram centrifugadas e o precipitado dissolvido em 0,2 mL de tampão de amostra de eletroforese, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, ditioneitol 100 nM, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1,25% (p/v), glicerol a 15% (v/v) e

azul de bromofenol a 0,006% (p/v). Antes da aplicação no gel de eletroforese as proteínas foram dosadas e as amostras contendo 10 µg de proteína mais 10µg de tampão da amostra foram fervidas em banho-maria por 1 min para desnaturação.

### **3.7 Dosagem de proteínas**

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977). As amostras de proteína (5 µL) foram diluídas em 1 mL de água destilada e adicionado 0,1 mL de desoxicolato de sódio (DOC) a 0,15%, seguido de incubação por 10 min à temperatura ambiente, para precipitação das proteínas. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 72% e a amostra foi centrifugada a 5.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, vertendo-se os tubos. O precipitado foi dissolvido em 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente A (CTC, NaOH 0,8 N, SDS a 10% (p/v) e água destilada 1:1:1:1). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min. O reagente CTC é composto por carbonato de cálcio a 20% (p/v), sulfato de cobre a 0,2% (p/v) e tartarato de potássio a 0,4% (p/v). A seguir foram adicionados 0,25 mL do reagente B (Folin: água destilada, 1:5) e após 30 min foram determinadas as absorvâncias a 750 nm.

### **3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS**

As proteínas (10 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida- SDS contendo 12% de acrilamida (v/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Todo o procedimento ocorreu em temperatura ambiente.

O gel de resolução de acrilamida a 12% foi preparado acrescentando-se 2 mL de acrilamida (30:0,8, acrilamida: bisacrilamida), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8, contendo SDS a 0,2 (p/v), 0,5 mL de água destilada, 50 µL de persulfato de amônia (PSA) a 10% (p/v) e 15 µL de TEMED. O gel de empacotamento a 4% foi preparado acrescentando-se 0,27 mL de acrilamida (30:0,8), 1 mL de tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, contendo SDS a 0,2% (p/v), 0,73 mL de água destilada, 20 µL de PSA e 10 µL de TEMED.

A cuba de eletroforese vertical foi montada e aplicado 10 µg das amostras de proteína na seguinte ordem: padrão de massa molecular, controle e tratados. O padrão de peso molecular



utilizado nas eletroforeses era composto por miosina (205 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), fosforilase-B (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A corrida eletroforética foi executada por 1h a 30 mA e em seguida foi realizada a transferência das proteínas para membrana. O gel foi corado com azul de Coomassie R250 por 30 min em agitador mecânico e na sequência descorado com solução de ácido acético:metanol:água (5:2,5:42,5).

### **3.9 Western blotting**

A expressão dos fatores de crescimento celular foi analisada utilizando-se seguintes os anticorpos: anti-VEGF da *R&D Systems* (MAB293); e anti-FGF-1 (H-125: sc-7910), anti-TGF $\beta$ 1 (D-12; sc-31608); anti-PDGF-A (H-77: sc-7958), anti-IGF-1 (H-70: sc-9013) ; anti-TGF $\alpha$  (H-50: sc-9043), *Santa Cruz Biotechnology*. As proteínas da pele submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foram transferidas para membrana de PVDF (TOWBIN et al.,1979). A seguir, a membrana contendo as proteínas foi fixada e bloqueada em PBS contendo 3% de BSA e 2% leite em pó, durante 1 h. A seguir foram lavadas com PBS contendo Tween 20 1% (v/v) (PBST). O *blot* foi então, incubado com o 1º anticorpo diluído em PBST 0,05/BSA durante 1 h. Após esse procedimento foram feitas as seguintes lavagens: duas vezes em PBST durante 5 min, duas vezes com solução de sais, PBST 0,05 contendo MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> 1 mM durante 5 min e com PBST 0,05/BSA durante 15 min. O *blot* foi incubado por 1 h, com o segundo anticorpo conjugado com a fosfatase alcalina. A seguir foram feitas duas lavagens com PBST durante 5 min, uma lavagem com sais durante 10 min e três lavagens com PBS durante 5 min. O *blot* foi incubado com NBT/BCIP (1mg/mL em PBS) para revelação das proteínas. Todos os resultados foram normalizados pela expressão de actina (I-19: SC-1616, *Santa Cruz Biotechnology*) para verificar eventuais diferenças na quantidade de proteínas de cada amostra. A densidade das bandas foi quantificada por densitometria usando o programa Kodak 1D 3.0. O controle foi considerado 100% e os resultados foram expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao controle.

### **3.10 Análise estatística**

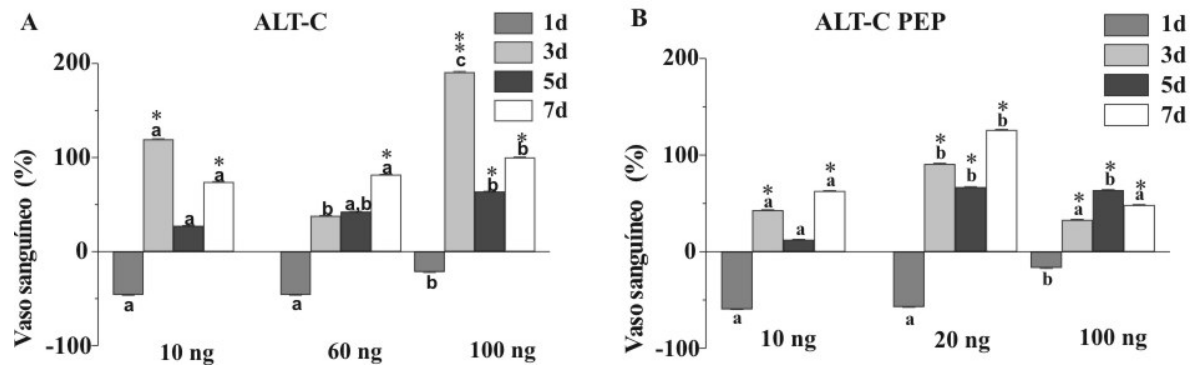
A média e o erro padrão foram determinados para cada grupo experimental. Para determinar a significância das diferenças observadas foi utilizada análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise histológica

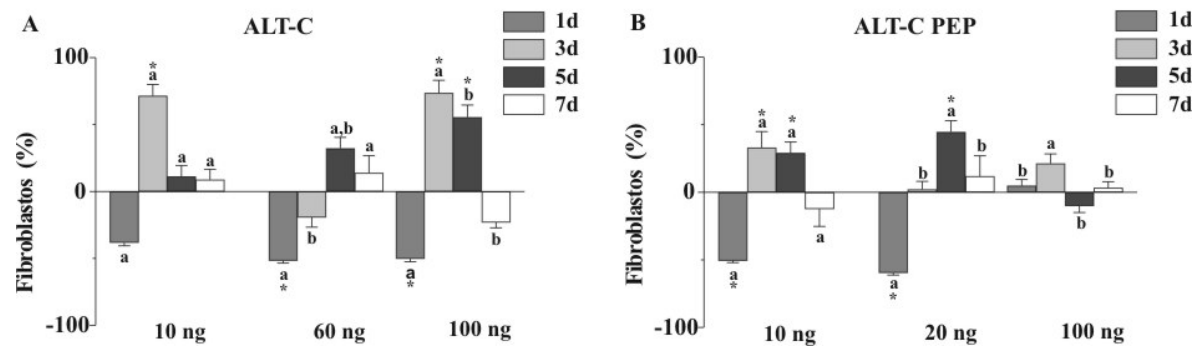
Os cortes histológicos estudados foram corados com hematoxilina-eosina, que permitiu avaliar a morfologia geral e medir a densidade de fibroblastos, infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) e vasos sanguíneos (Figuras 15 e 16). A coloração com picrossírius-hematoxilina permitiu avaliar a densidade de colágeno no local da lesão (Figuras 17 e 18).

O tratamento por 1 dia não alterou significativamente a densidade de vasos sanguíneos em nenhum dos grupos tratados em relação ao grupo CONTROLE, porém, aos 3 dias de tratamento, a densidade de vasos sanguíneos apresentou-se significativamente aumentada em todos os grupos tratados: ALT-C10 (+119,29%), ALT-C60 (+37,86%), ALT-C100 (+190,71%), ALT-C PEP10 (+42,86%), ALT-C PEP20 (+90,71%) e ALT-C PEP100 (+32,86%) quando comparados ao CONTROLE. O aumento da densidade de vasos sanguíneos apresentou-se aumentado após 5 de tratamento nos grupos: ALT-C60 (+42,27%); ALT-C100 (+66,64%); ALT-C PEP20 (+66,82%) e ALT-C PEP100 (+66,82%) quando comparados ao CONTROLE. Após 7 dias de tratamento, todos os grupos tratados apresentaram aumentos significativos: ALT-C10 (+73,89%); ALT-C60 (+81,67%); ALT-C100 (+100,00%); ALT-C PEP10 (+62,78%); ALT-C PEP20 (126,00%) e ALT-C PEP100 (+48,33%) em relação ao CONTROLE. O tratamento com ALT-C e ALT-C PEP mostraram-se angiogênicos, pois houve aumento da densidade de vasos sanguíneos e este se mostrou dependente do tempo e da concentração de ALT-C e ALT-C PEP. Foi observado pico máximo na densidade de vasos sanguíneos aos 3 dias, e seqüencialmente mantendo-se estável com o aumento do tempo (Figura 11, 15 e 16).



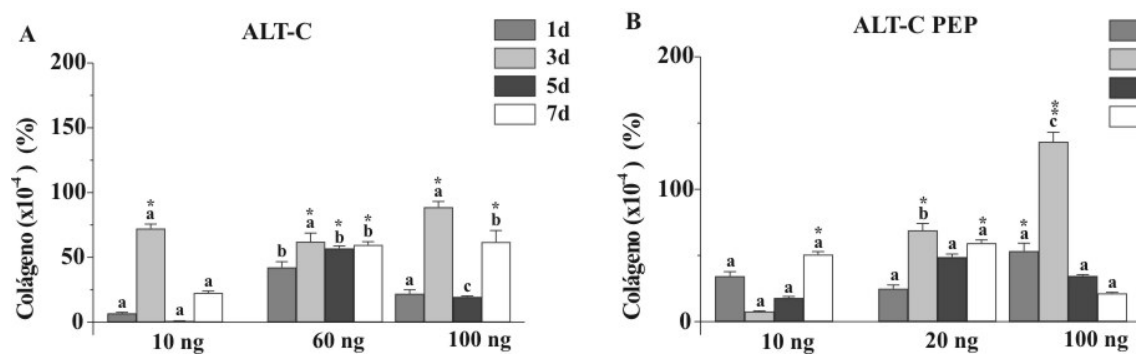
**Figura 11.** Densidade de vasos sanguíneos em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o CONTROLE (média  $\pm$  erro padrão da média). Aos 3 dias de tratamento houve aumento significativo nos grupos ALT-C10, ALT-C100, ALT-C PEP10, ALT-C PEP 20 e ALT-C PEP 100 quando comparados ao CONTROLE. Após 5 de tratamento nos grupos: ALT-C100; ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100 apresentaram aumentos significativos quando comparados ao CONTROLE. Após 7 dias de tratamento, todos os grupos tratados apresentaram aumentos significativos em relação ao CONTROLE. Observar que o aumento de vasos sanguíneos é correlacionado ao tempo e ao tratamento. Os tratamentos com ALT-C e com ALT-C PEP induzem a angiogênese (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

A densidade de fibroblastos, após 1 dia de tratamento, diminuiu significativamente nos grupos ALT-60 (-51,57%), ALT-C100 (-50,19%), ALT-C PEP10 (-50,56%) e ALT-C PEP20 (-59,55%) quando comparados ao CONTROLE, entretanto aos 3 dias de tratamento, a densidade de fibroblastos aumentou nos grupos ALT-C10 (+71,47%), ALT-C100 (+73,52%), ALT-PEP10 (+33,04%) e ALT-C PEP100 (+21,27%) quando comparados ao CONTROLE. Após 5 dias de tratamento, a densidade de fibroblastos aumentou significativamente nos grupos ALT-C60 (+82,86%), ALT-C100 (+44,54%), ALT-C PEP10 (+28,56%), ALT-C PEP20 (+44,54%) quando comparados ao grupo CONTROLE. Já nos grupos tratados por 7 dias as variações na densidade de fibroblastos nos grupos tratados não foram significativas (Figura 12).



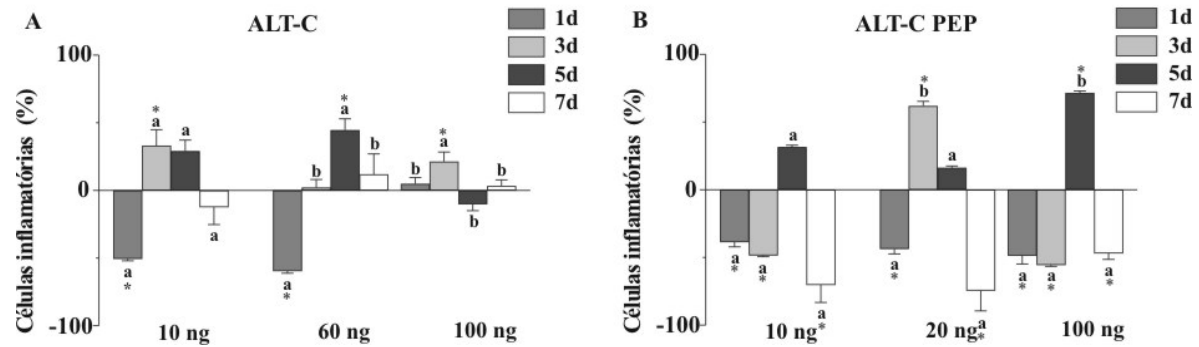
**Figura 12.** Densidade de fibroblastos em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o CONTROLE (média  $\pm$  erro padrão da média). Observar diminuição significativa 1 dia após a lesão nos grupos ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP 20, porém aos 3 dias após a lesão houve aumentos significativos nos grupos ALT-C10, ALT-C 100 e ALT-C PEP10. Aos 5 dias após a lesão houve aumento significativo nos grupos ALT-C100, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP20 quando comparados co CONTROLE (\*,  $p < 0.05$ ).

Quanto à densidade de colágeno, após 1 dia de tratamento, esta aumentou significativamente somente no grupo tratado ALT-C PEP100 (+53,19%) quando comparado ao CONTROLE. Aos 3 dias de tratamento, a densidade de colágeno apresentou aumentos significativos nos grupos tratados ALT-C10 (+72,15%), ALT-C60 (+61,89%), ALT-C100 (+88,60%), ALT-C PEP20 (+68,89%) e ALT-C PEP100 (+135,80%) quando comparados ao grupo CONTROLE. Após 5 dias de tratamento a densidade de colágeno foi significativamente maior no grupo ALT-C60 (+56,78%). Aos 7 dias de tratamento houve aumento significativo nos grupos tratados: ALT-C60 (+59,52%), ALT-C100 (+61,67%), ALT-C PEP10 (+50,50%) e ALT-C PEP20 (+59,12%) quando comparadas ao controle. Pode ser observado que o aumento da formação de colágeno se relaciona com o tempo pós-lesão e que ambos ALT-C e ALT-C PEP podem induzir a formação de colágeno (Figuras 13, 17 e 18).

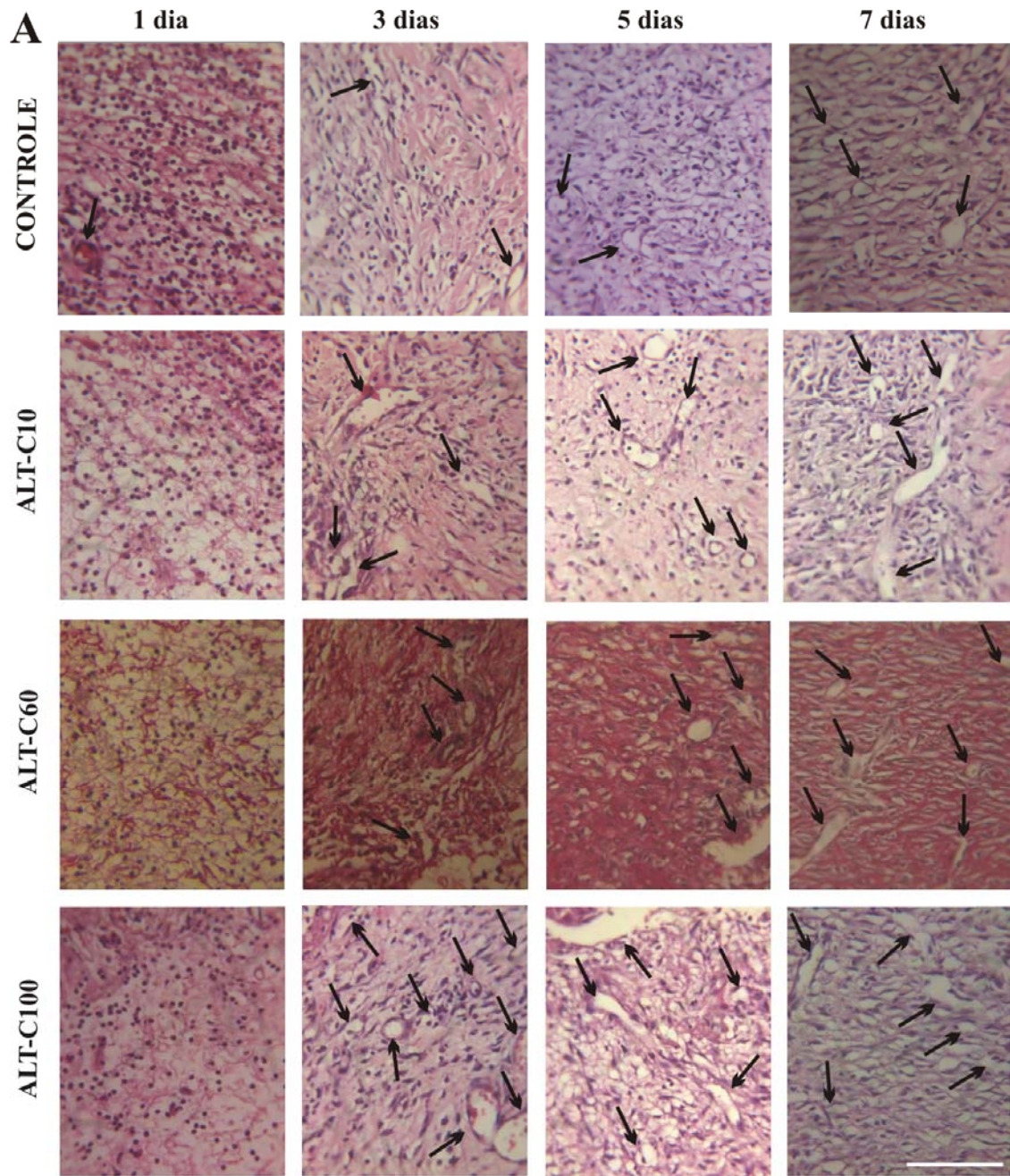


**Figura 13.** Densidade de colágeno em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o CONTROLE (média ± erro padrão da média). Após 1 dia de tratamento houve aumento significativo no grupo tratado ALT-C PEP100 quando comparado ao CONTROLE. Aos 3 dias de tratamento a densidade de colágeno apresentou aumentos significativos nos grupos tratados ALT-C10, ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100, quando comparados ao grupo CONTROLE. Após 5 dias de tratamento a densidade de colágeno foi significativamente maior no grupo ALT-C60. Aos 7 dias de tratamento houve aumento significativo nos grupos tratados: ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP20 quando comparadas ao CONTROLE. Observar que o aumento da expressão de colágeno se correlaciona ao tempo e ao tratamento. Os tratamentos com ALT-C e com ALT-C PEP induzem a expressão de colágeno (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

A densidade de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) após 1 dia de tratamento apresentou diminuição significativa nos grupos ALT-C10 (-51,02%), ALT-C60 (-54,56%), ALT-C PEP10 (-38,65%), ALT-C PEP20 (-43,67%) e ALT-C PEP100 (-48,68%), quando comparados ao grupo CONTROLE. Após 3 dias de tratamento observou-se aumento significativo da densidade de células inflamatórias nos grupos ALT-C60 (+48,00%) e ALT-C PEP20 (+61,79%), porém, nos grupos ALT-C10 (-54,56%), ALT-C100 (-56,58%), ALT-C PEP10 (-48,47%) e ALT-C PEP100 (-55,59%) houve diminuição significativa quando comparados ao grupo CONTROLE. Aos 5 dias de tratamentos os grupos ALT-C100 (+82,86%) e ALT-C PEP100 (+71,43%) apresentaram aumentos significativos da densidade de células inflamatórias em relação ao grupo CONTROLE. Contudo, aos 7 dias de tratamento houve diminuição significativa da densidade de células inflamatórias nos grupos tratados ALT-C100 (-48,88%), ALT-C PEP10 (-70,29%), ALT-C PEP20 (-74,44%) e ALT-C PEP100 (-46,96%), quando comparados ao grupo CONTROLE (Figura 14).

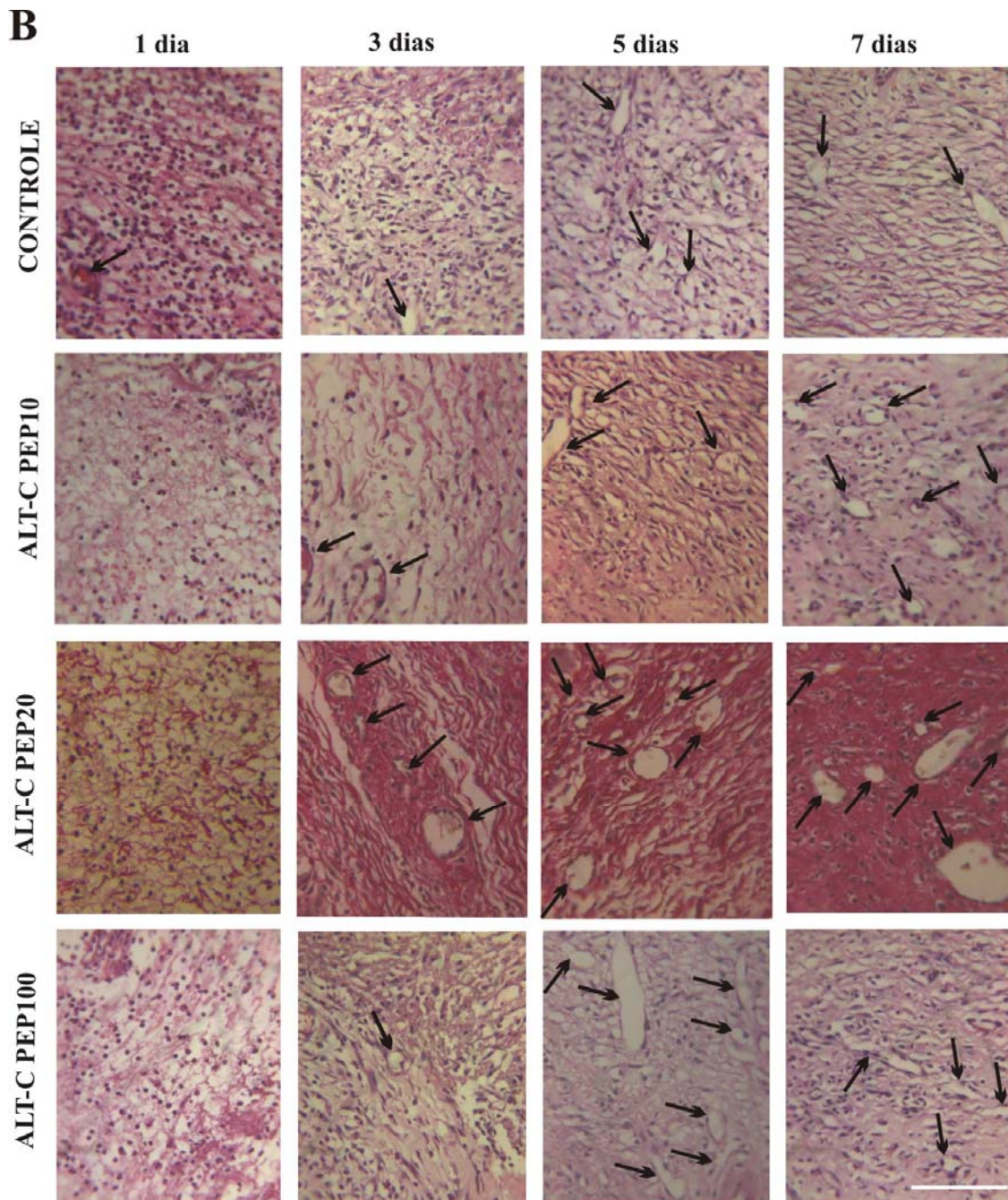


**Figura 14.** Densidade de células inflamatórias em porcentagem nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 ou 7 dias comparados com o CONTROLE (média  $\pm$  erro padrão da média). Após 1 dia de tratamento houve diminuição da densidade de células inflamatórias nos grupos ALT-C10, ALT-C60, ALT-CPEP10, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100, quando comparados ao grupo CONTROLE. Após 3 dias de tratamento, observou-se aumento significativo da densidade de células inflamatórias nos grupos ALT-C10, ALT-C100 e ALT-C PEP20 enquanto que nos grupos ALT-C60, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP100 houve diminuição significativa quando comparados ao grupo CONTROLE. Aos 5 dias de tratamento, os grupos ALT-C60 e ALT-C PEP100 apresentaram aumentos significativos da densidade de células inflamatórias em relação ao CONTROLE. Aos 7 dias de tratamento houve diminuição significativa da densidade de células inflamatórias nos grupos tratados: ALT-C PEP10, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100, quando comparados ao grupo CONTROLE (\*,  $p < 0.05$ ).



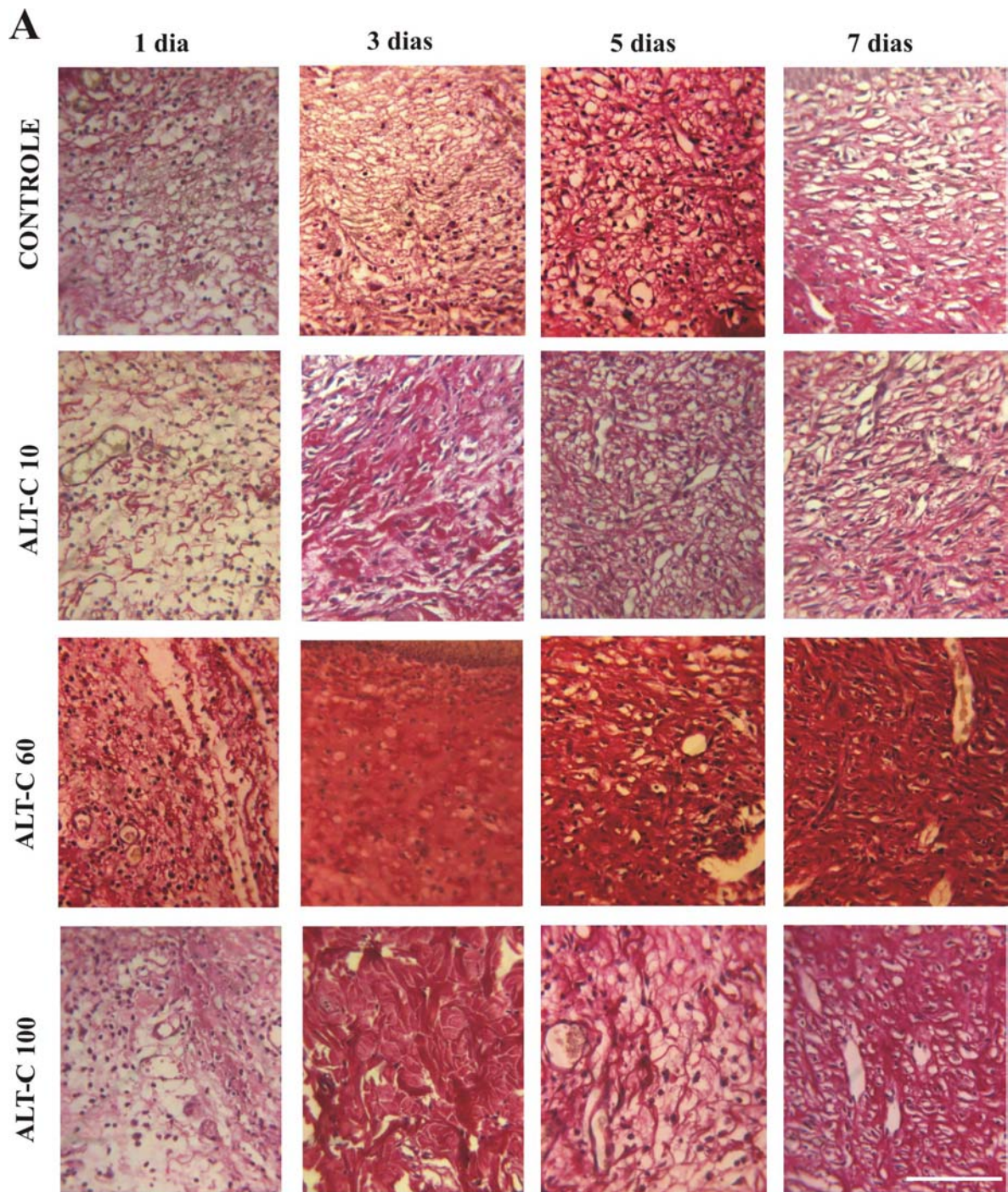
**Figura 15.** Fotomicrografia de pele de rato lesada, corada com hematoxilina-eosina, dos grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C por 1, 3, 5 e 7 dias. As setas indicam a formação de novos vasos sanguíneos na pele em regeneração. Barra = 100  $\mu$ m.





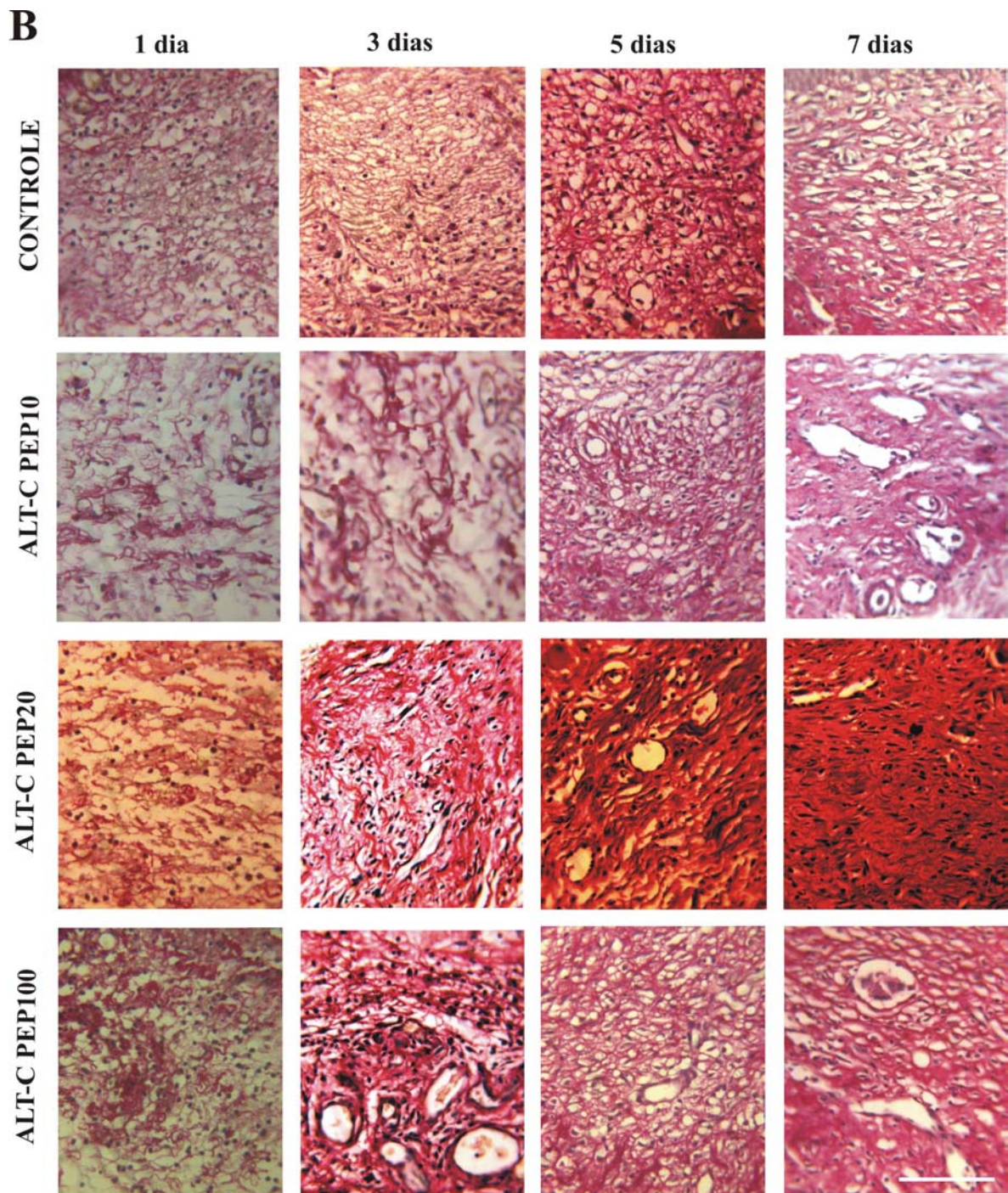
**Figura 16.** Fotomicrografia de pele de rato lesada, corada com hematoxilina-eosina, dos grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. As setas indicam a formação de novos vasos sanguíneos na pele em regeneração. Barra = 100  $\mu$ m.





**Figura 17.** Fotomicrografia de pele de rato lesionada, corada com picrossírios-hematoxilina, dos grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C por 1, 3, 5 e 7 dias. O aumento da cor avermelhada indica a maior deposição de colágeno. Barra = 100  $\mu$ m.





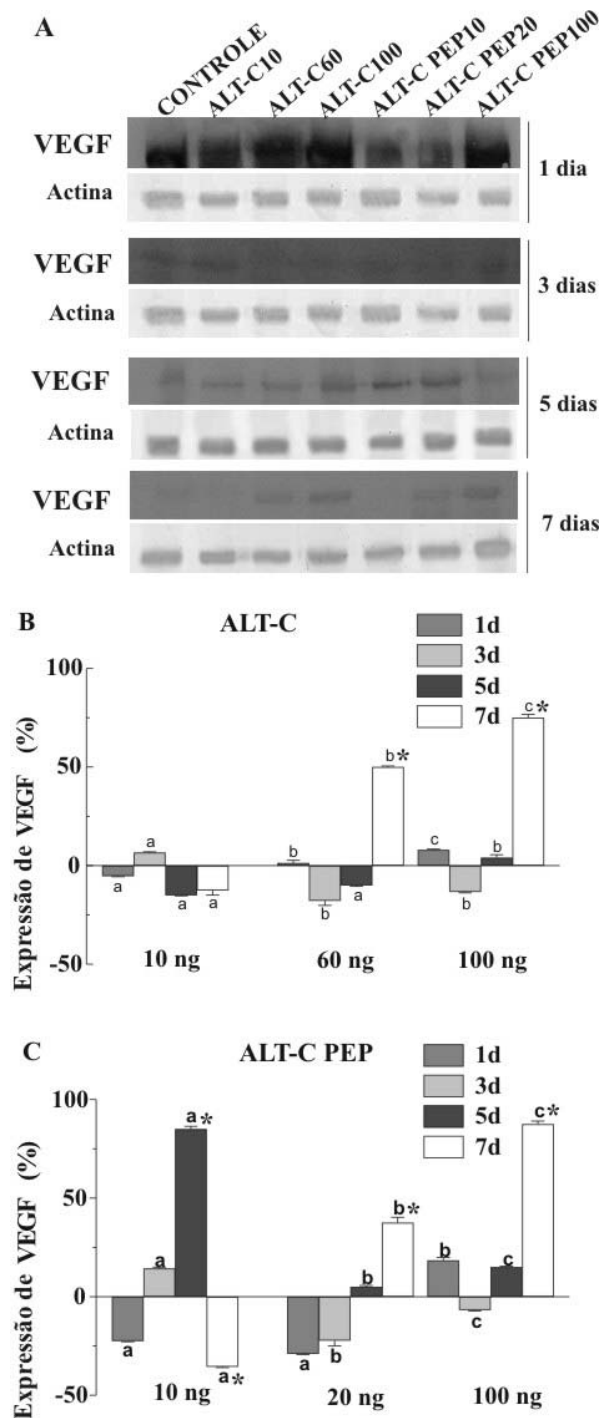
**Figura 18.** Fotomicrografia de pele de rato lesada, corada com picrossírios-hematoxilina, dos grupos controle e tratados com diferentes concentrações de ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. O aumento da cor avermelhada indica a maior deposição de colágeno. Barra = 100  $\mu$ m.

#### **4.2 Efeitos da ALT-C e do ALT-C PEP sobre expressão de fatores de crescimento**

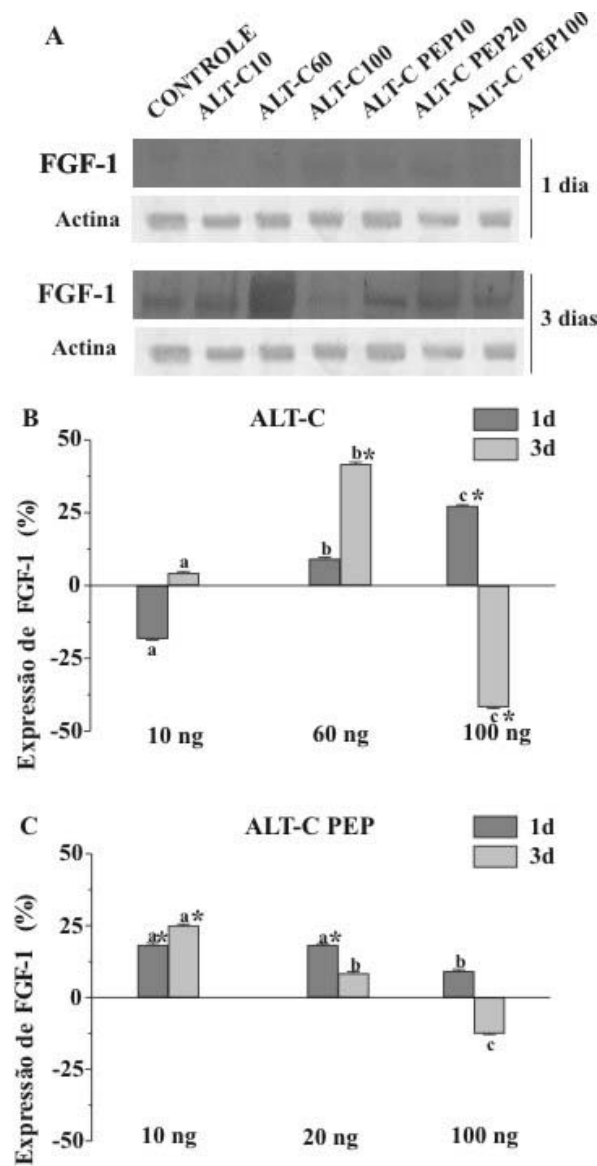
Todos os fatores de crescimento analisados VEGF, FGF-1, TGF $\beta$ 1, PDGF, IGF-1 e TGF estão envolvidos de forma direta e/ou indireta na angiogênese e no reparo tecidual.

O VEGF é considerado o mais potente fator de crescimento na indução da angiogênese, sendo expresso por vários tipos celulares tais como: células endoteliais, epiteliais, macrófagos e fibroblastos. Tanto a ALT-C quanto o ALT-C PEP modularam a expressão de VEGF. Aos 5 dias após a indução da lesão o grupo ALT-C PEP10 (+85,00%) apresentou aumento significativo da expressão de VEGF quando comparados ao CONTROLE. Nos grupos CONTROLE, a expressão de VEGF foi maior após 1 dia de tratamento, ocorrendo diminuição progressiva da sua expressão ao longo do tempo. Aos 7 dias após a indução da lesão observou-se aumento significativo nos grupos ALT-C60 (+50,00%), ALT-C100 (+75,00%), ALT-C PEP20 (+37,50%) e ALT-C PEP100 (+87,50), entretanto, o grupo ALT-C PEP10 (-35,00%) apresentou diminuição significativa quando comparados ao grupo CONTROLE (Figura 19).

O FGF-1 é um dos fatores de crescimento mais estudados e participa de processos que envolvem reparo tecidual e angiogênese. Sua expressão foi modulada pela ALT-C e pelo ALT-C PEP e foi detectado apenas até 3 dias após a injúria. Após 1 dia de lesão, o FGF-1 aumentou significativamente nos grupos ALT-C100 (+27,30%), ALT-C PEP10 (+18,20%) e ALT-C PEP20 (+18,2%). Aos 3 dias de lesão houve aumento significativo nos grupos ALT-C60 (+41,60%) e ALT-C PEP10 (+25,00%), entretanto houve diminuição no grupo ALT-C100 (-47,7%) (Figura 20).



**Figura 19.** Expressão de VEGF nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). Aos 5 dias de tratamento, o grupo ALT-C PEP10 apresentou aumento significativo na expressão de VEGF quando comparado ao grupo CONTROLE. Aos 7 dias de tratamento, observa-se o aumento da expressão de VEGF nos grupos tratados ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100, no entanto, o grupo ALT-C PEP10 apresentou inibição da expressão de VEGF quando comparados ao grupo CONTROLE (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 20.** Expressão de FGF-1 nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). Observar que a expressão de FGF-1 aumentou após 1 dia de tratamento nos grupos ALT-C100, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP10. Após 3 dias de tratamento houve aumento significativo ALT-C60 e ALT-C PEP10, entretanto houve diminuição no grupo ALT-C100. Sua expressão foi detectada até os 3 dias após a indução lesão (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1 e 3 dias. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

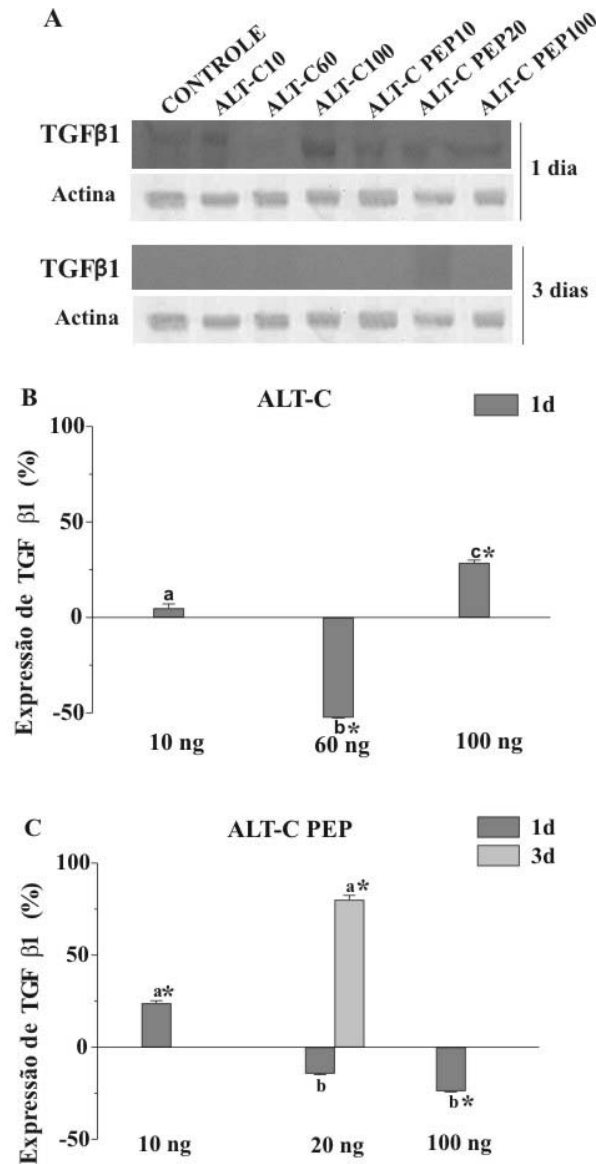
O TGF $\beta$ 1 é um fator de crescimento considerado multifuncional e atua no reparo tecidual, por promover a migração de fibroblastos e células endoteliais. A expressão de TGF $\beta$ 1 aumentou significativamente após 1 dia de tratamento nos grupos ALT-C100 (+28,60%) e ALT-C PEP10 (+23,80%), entretanto diminuiu nos grupos ALT-C60 (-52,40%) e ALT-C PEP100 (-23,80%) quando comparado ao CONTROLE. Aos 3 dias de tratamento apenas o grupo ALT-C PEP20 (+80,00%) apresentou aumento significativo quando comparado ao CONTROLE. Após 3 dias de lesão o TGF $\beta$ 1 não foi expresso (Figura 21).

A expressão de PDGF, um fator de crescimento secretado pelas plaquetas, macrófagos, fibroblastos e outros tipos celulares, ocorreu somente até 1 dia após a lesão. O tratamento induziu aumento significativo da expressão de PDGF nos grupos ALT-C60 (+53,80%), ALT-C PEP 10 (+34,80%) e ALT-C PEP 20 (+23,10%), contudo, o grupo ALT-C100 (-30,80%) apresentou diminuição quando comparado ao grupo CONTROLE (Figura 22).

O IGF-1 é liberado no local da lesão por plaquetas, fibroblastos e células endoteliais e neste estudo, foi detectado apenas até 1 dia após a indução da lesão. Os grupos: ALT-C60 (-36,00%), ALT-C PEP10 (-32,00%) e ALT-C PEP20 (-20,00%) apresentaram diminuição significativa da expressão de IGF-1, contudo o grupo ALT-C100 (+28,0%) que apresentou aumento significativo quando comparado ao CONTROLE (Figura 23).

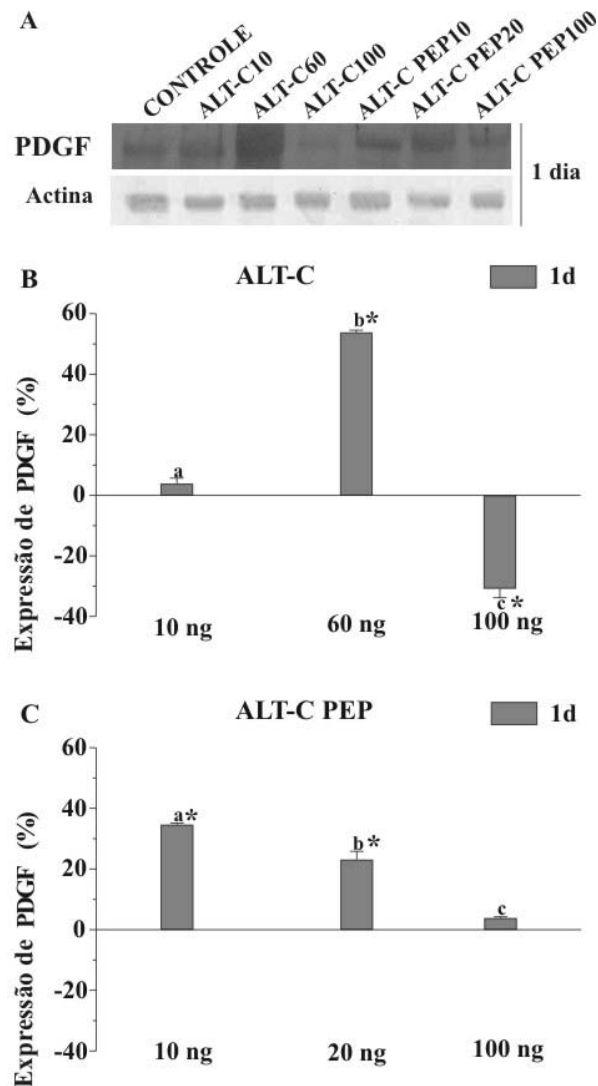
A liberação de TGF $\alpha$ , um fator de crescimento pertencente à família EGF, é feita por células da epiderme, macrófagos e fibroblastos. O TGF $\alpha$  foi expresso até 3 dias após a indução da lesão. Após 1 dia de lesão, os grupos estudados ALT-C10 (-28,60%), ALT-C PEP 20 (-23,80%) e ALT-C PEP100 (-28,60%) apresentaram diminuição significativa na expressão de TGF $\alpha$ , quando comparados ao CONTROLE. Aos 3 dias de lesão houve diminuição nos grupos ALT-C PEP10 (-21,40%) e ALT-C PEP100 (-42,80%) quando comparados ao CONTROLE (Figura 24).

A normalização dos dados foi realizada por comparação com a expressão de actina, uma proteína constitutiva que compõe aproximadamente 50% do total de proteína celular. A actina foi detectada igualmente nos grupos tratados e nos tempos analisados.

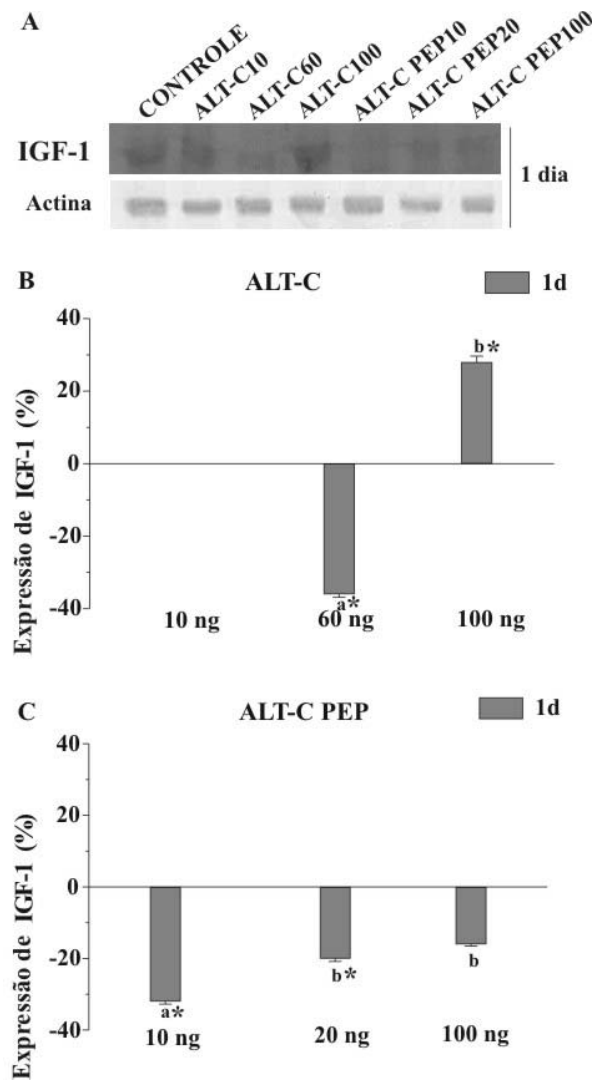


**Figura 21.** Expressão de TGFβ1 nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). A expressão de TGFβ1 aumentou significativamente após 1 dia de tratamento nos grupos ALT-C100 e ALT-C PEP10, entretanto diminuiu nos grupos ALT-C60 e ALT-C PEP100 quando comparado ao CONTROLE. Aos 3 dias de tratamento apenas o grupo ALT-C PEP20 apresentou aumento significativo quando comparado ao CONTROLE (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1 e 3 dias. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

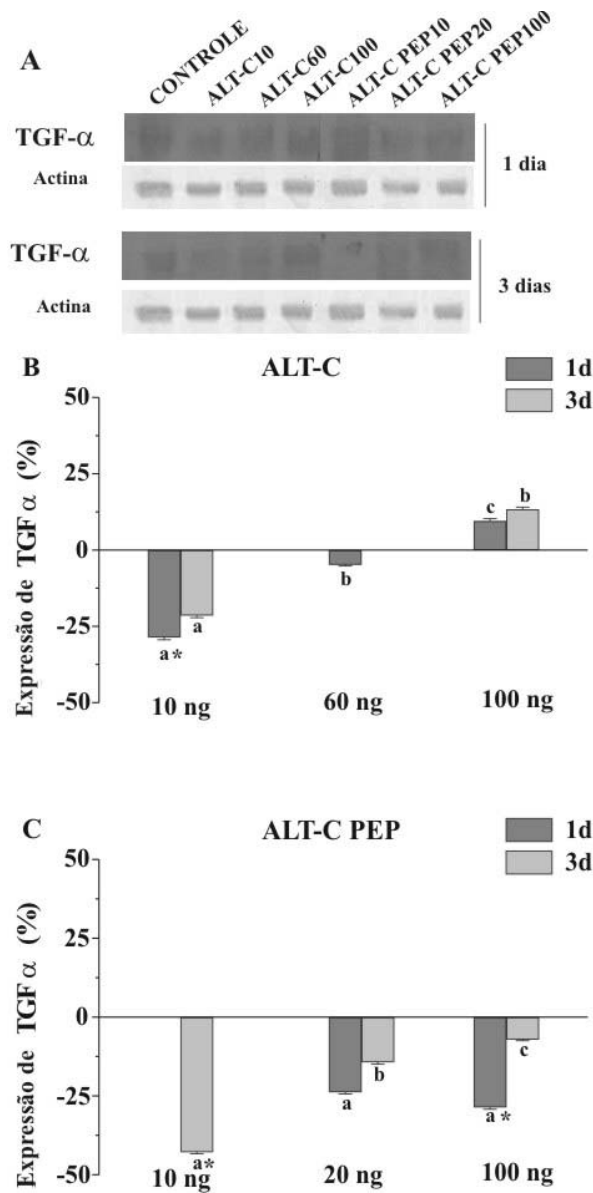




**Figura 22.** Expressão de PDGF nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). Observar que a expressão de PDGF foi detectada apenas 1 dia após a lesão. O tratamento induziu aumento significativo da expressão de PDGF nos grupos ALT-C60, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP 20, contudo o grupo ALT-C100, apresentou diminuição quando comparados ao grupo CONTROLE (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1 dia. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 23.** Expressão de IGF-1 nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). Observar que a expressão de IGF-1 foi detectada apenas 1 dia após a lesão. Os grupos: ALT-C60, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP20 apresentaram diminuição da expressão de IGF-1, contudo o grupo ALT-C100 que apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo CONTROLE (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 24.** Expressão de TGF $\alpha$  nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C ou ALT-C PEP por 1, 3, 5 e 7 dias. *Western blot* (A) e gráficos da desintometria das bandas do efeito do tratamento com ALT-C (B) e com ALT-C PEP (C). Observar que a expressão de TGF $\alpha$  foi detectada até os 3 dias após a lesão. Após 1 dia de tratamento, os grupos ALT-C10 ALT-C PEP100 apresentaram diminuição significativa na expressão de TGF $\alpha$ , quando comparados ao CONTROLE. Aos 3 dias de lesão houve diminuição nos grupos ALT-C PEP10 e ALT-C PEP10 quando comparados ao CONTROLE (\*,  $P < 0,05$ ). *Western blot* da expressão de actina no controle e nos grupos experimentais tratados com diferentes concentrações de ALT-C e ALT-C PEP por 1 e 3 dias. A actina é uma proteína celular constitutiva e foi utilizada para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 5. DISCUSSÃO

A Alternagina C (ALT-C) purificada do veneno de *B. alternatus*, é uma proteína que contém os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas (SOUZA et al., 2000). Cominetti et al. (2004) verificaram que a ALT-C em baixas concentrações induz à proliferação de células endoteliais (HUVECs) em contraste com as desintegrinas RGD que geralmente prejudicam a sobrevivência e a proliferação destas células (ESCALANTE et al., 2006; GUTIERREZ et al., 2005; 2006). Ramos et al., (2007) observaram que esses efeitos também ocorrem com o ALT-C PEP, um peptídeo derivado da estrutura primária da ALT-C, que produz efeitos similares em diferentes concentrações.

No presente trabalho investigaram-se os efeitos angiogênicos da ALT-C e do ALT-C PEP usando um modelo de lesão em pele de rato. Foram também analisadas as alterações morfológicas causadas pelo tratamento tanto com a ALT-C quanto com o ALT-C PEP e os efeitos deste tratamento sobre o reparo tecidual.

A análise morfológica da formação de vasos sanguíneos na pele de rato mostrou que, após 1 dia de tratamento, as diferenças entre os grupos controle e tratados não foram estatisticamente significativas. Entretanto, após 3, 5 e 7 dias, a densidade de vasos sanguíneos aumentou em todos os grupos tratados quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Estes aumentos foram predominantes nos grupos ALT-C100 e ALT-C PEP20. O tratamento induziu a proliferação de vasos sanguíneos em todas as áreas teciduais em regeneração. Este estudo demonstrou que ambos, ALT-C e ALT-C PEP induzem a proliferação de vasos sanguíneos e que este mecanismo envolve a modulação de fatores de crescimento. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Ramos et al. (2007) que observaram em estudos utilizando ALT-C ou ALT-C PEP ou FGF2 (controle) incorporado ao matrigel e implantado subcutaneamente no abdome de camundongos induziu fortemente a angiogênese, no qual a ALT-C em baixas

concentrações (10 e 100 ng) aumentou significativamente a densidade de vasos sanguíneos em relação ao grupo CONTROLE ( $p < 0,01$ ).

Todos os tratamentos modularam a expressão dos fatores de crescimento. A expressão de VEGF foi a mais predominante no presente estudo. A expressão de VEGF diminuiu gradualmente de 1 a 7 dias no grupo controle. Aos 7 dias após a lesão o grupo controle não mais expressava VEGF, contudo nos grupos tratados ALT-C60, ALT-C100, ALT-C PEP20 e ALT-C PEP100 a expressão se manteve. Cominetti et al. (2004) verificaram que a ALT-C estimula a adesão e proliferação de células endoteliais (HUVECs) e induz a expressão de VEGF em fibroblastos humanos em cultura. Posteriormente, Ramos et al. (2007) verificaram que diferentes concentrações de ALT-C estimulam a expressão gênica do receptor VEGF2 (VEGF2/KDR), mas não de VEGFR1 em HUVECs. Estes receptores podem ser expressos tanto no endotélio vascular quanto no endotélio linfático (XIE et al., 2004). O VEGF é essencial para o desenvolvimento do processo angiogênico tanto em condições de reparo tecidual quanto na homeostasia vascular no adulto (LEE et al., 2007). O aumento da expressão de VEGF pode induzir aumento da angiogênese como demonstram os resultados deste estudo. A expressão de VEGF aos 7 dias sugere que a angiogênese possa se prolongar por mais tempo. Estudos também indicam uma similaridade entre a ligação VEGF/VEGFR e o sistema integrina/matriz extracelular durante a angiogênese. Os mecanismos de comunicação direta ainda não estão claros, mas parecem convergir para cascatas de ativação intracelular que envolve adesão focal e possivelmente a ativação da via Akt/PKB, PI3K e p38 MAPK (SENGER et al., 2002; SWEENEY et al., 2003; COMINETTI et al., 2004; FERRARA, 2004; KOWANETZ & FERRARA, 2006).

A expressão de FGF-1 também foi modulada pela ALT-C e ALT-C PEP. A expressão de FGF-1 aumentou após 3 dias de lesão no grupo CONTROLE e mesmo tempo de tratamento aumentou expressivamente no grupo ALT-C60, porém diminuiu no grupo ALT-C100. Após 3 dias de lesão o FGF-1 não foi mais expresso. O FGF-1 é um fator de crescimento considerado pleiotrópico (ZAKRZEWSKA et al, 2004). Liga-se a receptores FGFR localizados na membrana celular das células endoteliais e ativa a proliferação celular. Apresenta um importante papel na degradação da MEC durante a primeira fase da angiogênese por ativar nas células endoteliais a produção de uPA (conversor de plasminogênio em plasmina) e a produção de MMPs incluindo a MMP-3 (estromelisina), MMP-1, MMP-2 e MMP-9 (colagenases) que degradam a fibrina e outras proteínas da matriz permitindo a migração celular (PRESTA et al., 2005). Estes dados

sugerem que o aumento da expressão de FGF-1 provocado pela ALT-C pode interferir, beneficiando o processo angiogênico e com isso, acelerar o processo cicatricial.

Imediatamente após a lesão, grandes quantidades de TGF $\beta$ 1 são liberados pelas plaquetas. O aumento da expressão de TGF $\beta$ 1, juntamente com outros agentes, dispara a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos para o local da lesão. Estas células por sua vez, também liberam TGF $\beta$ 1. Essa combinação resulta em fibroplasia, neoformação de vasos sanguíneos e síntese de MEC que formam o tecido de granulação. Estimulam também a migração de queratinócitos que favorece a reepitelização, além de ativar um subtipo de fibroblasto a se diferenciar em miofibroblasto, que expressam uma forma de actina e miosina que ao se contrair contribuem para diminuir o tamanho da lesão (WERNER & GROSE, 2003). Os resultados deste trabalho mostram que a expressão de TGF $\beta$ 1 aumentou após 1 dia de tratamento nos grupos ALT-C10, ALT-C100 e ALT-C PEP10. Aos 3 dias de tratamento o grupo ALT-C PEP20 apresentou aumento quando comparado ao grupo CONTROLE. Após 3 dias de lesão o TGF $\beta$ 1 não mais foi expresso.

Envolvidos com angiogênese e o reparo tecidual, a expressão de IGF-1 e TGF $\alpha$  também foi objeto de estudo deste modelo experimental. Assim como os outros fatores de crescimento estudados, sua expressão ao longo do tempo é concentração-dependente. O IGF-1 é um potente estimulador de mitose e sobrevivência em diferentes tipos celulares e exerce funções de forma autócrina, parácrina e endócrina. Na pele normal, apenas poucas células da epiderme e derme expressam IGF-1, contudo, quando lesada, todas as células da derme, além macrófagos e algumas outras células inflamatórias expressam IGF-1 entre 1-3 dias (WERNER & GROSE, 2003). Neste estudo houve aumento significativo na expressão de IGF-1 no grupo ALT-C100 em relação ao CONTROLE. O IGF-1 somente foi expresso 1 dia após a lesão.

A liberação de TGF $\alpha$ , um fator de crescimento pertencente à família EGF, é feita por células da epiderme, macrófagos e fibroblastos e exerce sua função se ligando ao EGFR, uma proteína transmembrana tirosina quinase que é expressa por diferentes tipos celulares (WERNER & GROSE, 2003). O TGF $\alpha$  foi expresso após 1 e 3 dias de lesão. Nos grupos ALT-C100, houve aumento na expressão de TGF $\alpha$  após 1 e 3 dias, em relação aos respectivos grupos CONTROLE. Nos demais grupos estudados em ambos os tempos, 1 e 3 dias, houve diminuição da sua expressão quando comparados ao CONTROLE. Não houve expressão de TGF $\alpha$  após 3 dias de lesão. O TGF $\alpha$  promove a reepitelização por estimular a motilidade e a proliferação dos

queratinócitos dos bordos da lesão e que envolvem os apêndices da pele tais como: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebácias. Esse processo é extremamente importante, pois restabelece a integridade da pele (SINGER & CLARK, 1999).

Os fibroblastos são células mesenquimais muito importantes durante o reparo tecidual. A fibroplasia se caracteriza por proliferação e migração dos fibroblastos no local da lesão e pela produção de colágeno tipo III e outros componentes de matriz como glicosaminoglicanos e fibronectina, que contribuem para a formação de tecido de granulação (BROUGHTON II et al, 2006; LI et al., 2007). Cominetti et al. (2004), demonstraram que a ALT-C inibe a adesão de fibroblastos de camundongo para colágeno tipo I (NIH-373) e que essa inibição é dose dependente. Neste estudo, o tratamento com a ALT-C ou com o ALT-C PEP parece estimular a diferenciação e migração dos fibroblastos, pois promoveu aumentos de sua densidade aos 3 e 5 dias. Após 1 dia de tratamento, as diferenças entre os grupos CONTROLE e tratados não foram estatisticamente significativas, porém os aumentos foram significativos nos grupos ALT-C10, ALT-C100, ALT-C PEP10 aos 3 dias e nos grupos ALT-C100, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP20 aos 5 dias de tratamento, quando comparado aos respectivos grupos CONTROLE.

Tanto a proliferação quanto a migração dos fibroblastos são estimulados por fatores quimiotáticos e de crescimento liberados pelas plaquetas e macrófagos. Ambos, plaquetas e macrófagos liberam PDGF (BROUGHTON II et al, 2006; LI et al., 2007). Neste estudo, a ALT-C e o ALT-C PEP modularam de a expressão de PDGF. Após 1 dia de tratamento, houve aumento significativo da expressão de PDGF nos grupos ALT-C60, ALT-C PEP10 e ALT-C PEP20. Isso pode sugerir uma possível relação entre sua expressão e a densidade de fibroblastos. A presença de PDGF não foi detectada nos outros tempos estudados.

A proliferação dos fibroblastos também é estimulada pelo ambiente ácido causado pela baixa concentração de oxigênio no interior da lesão. Com a angiogênese, a formação de novos vasos sanguíneos aumenta o suprimento de oxigênio, diminuindo o estímulo (LI et al, 2007). Este fato pode ser uma das causas da diminuição da densidade de fibroblastos aos 7 dias após a lesão, apresentados neste estudo.

Integrinas são receptores de adesão celular que ancoram as células aos componentes da MEC (CLEMETSON, 1998). As integrinas,  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  se ligam ao colágeno através do domínio  $\alpha I$  e  $\alpha 2I$ . A integrina  $\alpha 2\beta 1$  é expressa na membrana de vários tipos celulares que incluem plaquetas células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, linfócitos, dentre outras (HEINO,

2000). A interação de distintos ligantes à integrina  $\alpha 2\beta 1$  ativa cascatas de sinalização intracelular via p125<sup>FAK</sup> e p38 MAPK e induz a expressão colágeno tipo I e das MMP-1 e MMP-13 (colagenases 1 e 3 respectivamente) que participam do processo de remodelagem e de regeneração tecidual, promovendo reorganização da matriz colagenosa. Durante o processo de reparo tecidual, nos fibroblastos a expressão de  $\alpha 1\beta 1$  diminui e a de  $\alpha 2\beta 1$  aumenta (HEINO, 2000; POPOVA, et al, 2007). Estudos prévios demonstram que a ALT-C inibe a adesão de colágeno I a células K562  $\alpha 2\beta 1$ -transfectadas. Essa inibição é dose dependente e específica a células que expressam a integrina  $\alpha 2\beta 1$  (SOUZA et al., 2000). Neste trabalho, ambos, ALT-C e ALT-C PEP estimularam a síntese de colágeno em todos os tempos estudados. Os maiores aumentos aconteceram aos 3 dias de tratamento com os grupos ALT-C10, ALT-C60 e ALT-C100 e aos 7 dias nos grupos ALT-C100 e ALT-C PEP20. O colágeno é o principal elemento que substitui a MEC provisória baseada em fibrina. No tecido em reparo, promove resistência e facilita o movimento de células endoteliais e macrófagos (BAUM & ARPEY, 2005; LI et al., 2007). Sua síntese, pelos fibroblastos começa entre 3 e 5 dias após a lesão e é estimulado por fatores de crescimento que incluem PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, IGF-1, dentre outros (BAUM & ARPEY, 2005). Verificamos neste estudo que, tanto a ALT-C quanto o ALT-C PEP aumentam a síntese de colágeno. Estes dados demonstram uma aceleração na deposição de colágeno, podendo indicar um possível efeito pró-inflamatório da ALT-C e do ALT-C PEP. Estes resultados provavelmente estão relacionados pela modulação da expressão de fatores de crescimento promovidos pelo tratamento com ALT-C e ALT-C PEP.

Trabalhos prévios *in vitro* demonstraram que a ALT-C induz quimiotaxia de neutrófilos e que esta ativação é dependente da concentração. A atividade quimiotática da ALT-C (100 nM) foi similar à promovida pela fMLP (100 nM), um agente quimiotático clássico. O ALT-C PEP promoveu efeitos semelhantes, porém, em altas concentrações (1000 nM). Este efeito nos neutrófilos envolve rearranjo da actina do citoesqueleto e atividade FAK, PI3K e Erk-2 (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Neste trabalho verificou-se que a ALT-C e o ALT-C PEP modulam a quimiotaxia de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos). A densidade células inflamatórias aumentou nos grupos tratados com ALT-C, porém, diminuiu nos grupos tratados com ALT-CPEP quando comparados ao CONTROLE, 1 dia após a lesão. Contudo, aos 7 dias de tratamento houve diminuição da densidade de células inflamatórias em



todos os grupos tratados. A ALT-C nas concentrações estudadas 10, 60 e 100 ng, demonstrou ação antiinflamatória e cicatrizante sobre lesão cutânea em rato.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou pela primeira vez que uma proteína pertencente ao grupo das desintegrinas de veneno de serpentes estimula angiogênese em pele lesada. Os resultados permitem concluir que tanto a ALT-C como o ALT-C PEP estimularam a regeneração tecidual, apresentaram atividade angiogênica, induziram a síntese de colágeno tipo I e modularam a expressão de fatores de crescimento celular. Esses efeitos foram dependentes do tempo e da concentração de ALT-C e de ALT-C PEP.

A ALT-C e o ALT-C PEP parecem exercer seus efeitos por meio da ligação à integrina e da modulação da expressão de fatores de crescimento celular, especialmente VEGF e FGF-1. Ambos, ALT-C e ALT-C PEP parecem ser bons candidatos para o desenvolvimento de um novo fármaco auxiliar da regeneração de pele lesada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINSON, J. M.; PENNINGTON, C. J.; MARTIN, S. W.; ANIKIN, V. A.; MEARNS, A. J.; LOADMAN, P. M.; EDWARDS, D. R.; GILL, J. H. Membrane type matrix metalloproteinases (MMPs) show differential expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) compared to normal lung: correlation of MMP-14 mRNA expression and proteolytic activity. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 11, p.1764-1771, 2007.

BAUER, S. M.; BAUER, R. J.; VELAZQUEZ, O. C. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. **Vascular and Endovascular Surgery**, v. 39, n. 4, p. 293-306, 2005.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. **Dermatologic Surgery**, v, 31, n.6, p. 674-689, 2005.

BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix Metalloproteinases: A Review\*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, n.2, p. 197-250, 1993.

BRIDGES, L. C.; BOWDITCH, L. D. ADAM: Integrin Interaction: Potential Integrin Regulated Ectodomain Shedding Activity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 837-847, 2005.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p.12S-34S, 2006.

CALVETE J. J. Structure-function correlations of venom disintegrins. **Current Pharmaceutical of Design**, v.11, p. 829-835, 2005.

CALVETE J. J., MARCINKIEWICZ C., MONLEÓN D., ESTEVE V, CELDA, B, JUAREZ P., SANZ L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, p.1063–1074, 2005.

CIDADE D. A. P.; WERMELINGER L. S.; LÔBO-HAJDU; G.; DÁVILA, A. M. R.; BON, C.; ZINGALI, R. B; ALBANO, R. M. Molecular diversity of disintegrin-like domains within metalloproteinase precursors of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 48, p. 590–599, 2006.

CLEMETSON, K. J. Introduction: integrins, dynamic cell receptors. **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, n. 499–501, 1998.

COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H. B.; RAMOS, O. H. P.; FOX, J. F.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; FREITAS, FIGUEIREDO, C. C.; ORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Alternagin-C, a desintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression e endothelial cell proliferation in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n. 18, p. 18247-18255, 2004.

CONNORS, W. L.; JOKINEN, J.; WHITE, D. J.; PURANEN, J. S.; KANKAANPÄÄ, P.; UPLA, P.; TULLA M.; JOHNSON, M. S.; HEINO, J. Two Synergistic Activation Mechanisms of  $\alpha_2\beta_1$ Integrin-mediated Collagen Binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n.19, p. 14675–14683, 2007.

CONWAY, E. M., COLLEN, D., CARMELIET, P., Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 507–521, 2001.

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI K, ANDREWS, R. K.; BERNDT, M.C. Jararhagin and Jaracetin: Novel Snake Venom Inhibitors of the Integrin Collagen Receptor,  $\alpha_2\beta_1$ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, p. 570-576, 1995.

DEDHAR, S.; WILLIAMS, B., HANNIGAN, B. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signaling. **Cell Biology**, v. 9, p. 319-323, 1999.

EDMONDSON, S. R.; THUMIGER, S. P; WERTHER, G. A.; WRAIGHT, C. J. Epidermal homeostasis: The role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. **Endocrine Reviews**, v.24, n.6, p.737–764, 2003.

ELICEIRI, B. P. Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk. **Circulation Research**, v. 89, p. 1104-1110, 2001.

ELLIS, I. R.; SCHOR, A. M.; SCHOR, S. L. EGF AND TGF- $\alpha$  motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 732-742, 2007.

EMSLEY, J.; C. GRAHAM KNIGHT, RICHARD W. FARNDALE, MICHAEL J. BARNES, ROBERT C. LIDDINGTON Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin  $\alpha 2\beta 1$ . **Cell**, v. 101, p. 47-56, 2000.

EMSLEY, J.; KNIGHT; C. G.; FARNDALE, R. W.; BARNES, M. J. Structure of the Integrin  $\alpha 2\beta 1$ -binding Collagen Peptide. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, p.1019-1028, 2004.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 455, p. 144-53, 2006.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

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

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v.8, p. 909–920, 2008.

GOUMANS, M., LEBRIN, F.; VALDIMARSDOTTIR, G. Controlling the Angiogenic Switch. A Balance between Two Distinct TGF- $\beta$  Receptor Signaling Pathways. **TCM**, v. 13, n. 7, p. 301-307, 2003.

GOUVÊA, C. M. C. P.; SILVA-JÚNIOR, R. A. Efeito do ácido retinóico sobre a cicatrização da epiderme de rato. **Revista da Universidade de Alfnas**, v. 5, p. 51-56, 1999.

GRENACHE, D. G.; ZHANG, Z.; WELLS, L.E.; SANTORO, S. A.; DAVIDSON, J. M.; ZUTTER, M. M. Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p. 455-467, 2007.

GULLBERG, D. E.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Collagen-binding I Domain Integrins - I what do they do? **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, p. 3-54, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **Microvascular Research**, v. 71, p. 55-63, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

HASTEN, D. L.; MORRIS, G. S.; RAMANADHAM, S.; YARASHESKI, K. E. Isolation of human skeletal muscle myosin heavy chain and actin for measurement of fractional synthesis rates. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 275, p. E1092-E1099, 1998.

HEINO, J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. **Matrix Biology**, v. 19, p.319 – 323, 2000.

HERREN, B.; RAINES, E. W. ROSS R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. **FASEB Journal**, v. 11, n. 2, p. 173-180, 1996.

HOLLENBECK, S. T.; ITOH, H.; LOUIE, O.; FARIES, P. L.; LIU, B. Type I collagen synergistically enhances PDGF-induced smooth muscle cell proliferation through pp60src-dependent crosstalk between the  $\alpha 2\beta 1$  integrin and PDGF $\beta$  receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, p.328–337, 2004.

HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 527–540, 1998.



HUXLEY-JONES, J.; CLARKE, T.; BECK, C.; TOUBARIS, G.; ROBERTSON, D. L.; BOOTHANFORD, R. P. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 63, 2007.

JENKINS, G. The role of proteases in transforming growth factor- $\beta$  activation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2008. (*in press*)

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich Domains of Atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 20, p. 13094–13102, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 41, p. 267-274, 1978.

KOWANETZ, M., FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 17, p. 5018-5022, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-6855, 1970.

LEBRIN, F.; DECKERS, M.; BERTOLINO, P.; TEN DIJKE, P. TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 599– 608, 2005.

LEE, T.-H., SENG, S., LI, H., KENNEL, S.J., AVRAHAM, H.K., AVRAHAM, S., Integrin Regulation by Vascular Endothelial Growth Factor in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Role of  $\alpha 6\beta 1$  Integrin in Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p.40450–40460, 2006.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.9–18, 2007.

LOHI, J.; WILSON, C. L.; ROBY, J. D.; PARKS, W. C. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. **The Journal Biology Chemistry**, v. 276, n.13, p. 10134-10144, 2001.

LONGHURSTA, C. M.; JENNINGS, L. K., Integrin-mediated signal transduction **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 514–526, 1998.

MARIANO-OLIVEIRA, A., COELHO, A. L. J., TERRUGGI, C. H. B., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., BARJA-FIDALGO C., DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a non RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4799–4808, 2003.

MARTIN, P. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

MAZZI, M. V.; MAGRO, A. J.; AMUI, S. F.; OLIVEIRA, C. Z.; TICLI, F. K.; STÁBELI, R. G.; FULY, A. L.; ROSA, J. C.; BRAZ, A. S. K.; FONTES, M. R. M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of B<sub>j</sub>ssuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Journal Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, p. 69–85, 2007.

MELO, R. M, GOUVÊA, C. M. C. P, SILVA, A. L. Efeito do ultra-som na prevenção da hérnia incisional mediana no rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 100-108, 2005.

MONLEÓN, D.; MORENO-MURCIANO, M. P.; KOVACS, H.; MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J. J.; CELDA B. Concerted Motions of the Integrin-binding Loop and the C-terminal Tail of the Non-RGD Disintegrin Obtustatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45570–45576, 2003.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, p. 2893-2905, 2007.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A. S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, LEBRUN, D. I.; SHANNON, J. D; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.409 p.395–401, 2003.

PARKS, W. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 423-432, 1999.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

POPOVA, S. N.; LUNDGREN-AKERLUND, WIIG, E. H.; GULLBERG, D. Physiology and pathology of collagen receptors. **Acta Physiologica**, v.190, p.179–187, 2007.

PRESTA, M., DELL'ERA, P., MITOLA, S., MORONI, E., RONCA, R., RUSNATI, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.16, n. 2, p. 159-178, 2005.

RAMOS, O. H. P. Desintegrinas de *Bothrops alternans*: BIOLOGIA MOLECULAR, ESTUDOS *IN VITRO* E BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL. Tese de doutorado defendida pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução na Universidade Federal de São Carlos, 2005.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases – Structure and function of catalytic and disintegrin domain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, n. 5, p. 621-527, 2006.

RAMOS, O. H.; TERRUGGI, C. H.; RIBEIRO, J. U.; COMINETTI, M. R.; FIGUEIREDO, C. C.; BERARD, M.; CREPIN, M.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by Alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops*

*alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 461, p. 1-6, 2007.

ROCHA, M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Birron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.2, p.383-393, 2005.

RODRIGUES, E. B.; ROSSI, E. E.; GRUMANN JUNIOR, A.; MEYER, C. H.; HO, A. C. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. n.5, p. 756-765, 2006.

ROODT, A. R.; LITWIN, S. L.; ANGEL, S. O. Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.135, p. 469–479, 2003.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 267-285, 2005.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y., TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochemistry Journal**, v.334, p. 93-98, 1998.

SENGER, D. R.; PERRUZZI, C. A.; STREIT, M.; KOTELIANSKY, V. E.; DE FOUGEROLLES, A. R.; DETMAR, M. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell

migration, and tumor angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, p. 195-204, 2002.

SHIH, A.; HOLLAND, E. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. **Cancer Letters**, v.232, n. 2, p. 139-147, 2006.

SHIMAOKA, M.; TAKAGI, J.; SPRINGER, T. A. Conformational Regulation of Integrin Structure and Function. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, v. 31, p. 485–516, 2002.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n.. 10, p. 738-746, 1999.

SERRANO, S. M. T.; JIA, L. G.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 69–76, 2005.

SOUZA, D. H. F.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L. V.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits  $\alpha 1\beta 2$  integrin-mediated cell adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 2, 15, pp. 341–350, 2000.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, Supl. 2A, p. 27-38, 1998.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **The Journal of Pathologic**, v. 200, n. 4, p. 448-464, 2003.

STANCHI, N. O.; DILORENZO, C.; GÓMEZ, C. M.; GRISOLIA, C.; COPES, J. Characterization of *Bothrops* venoms of Argentina by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analecta Veterinaria**, v.19, p. 62-65, 1999.

SWEENEY, S. M.; DILULLO, G.; SLATER, S. J.; MARTINEZ, J.; IOZZO, R. V.; LAUER-FIELDS, L. J.; FIELDS, G. B.; SAN ANTONIO, J. D. Angiogenesis in Collagen I Requires  $\alpha 2\beta 1$  Ligation of a GFP\*GER Sequence and Possibly p38 MAPK Activation and Focal Adhesion Disassembly\*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 30516–30524, 2003.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 550-563, 2005.

TONINI, T.; ROSSI, F.; CLAUDIO, P. P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v.22, p.6549-6556, 2003.

TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VAN LINT, P.; LIBERT, C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 1-7, 2007.

VERMA, R. P., HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15 p. 2223–2268, 2007.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry **Circulation Research**, v. 2, 2003.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835–870, 2003.

WHITE, D. J.; PURANEN, S.; JOHNSON, M. S. HEINO, J. The collagen receptor subfamily of the integrins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1405–1410, 2004.

WIPFF, P.; HINZ, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 – An intimate relationship. **European Journal of Cell Biology**, 2008. (*in press*)



XIE, X.; WEI, D.; SHI, Q.; HUANG, S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, p.297–324, 2004.

ZAKRZEWSKA, M.; KROWARSCH, D.; WIEDLOCHA, A.; OTLEWSKI, J. Design of fully active FGF-1 variants with increased stability. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 17, n. 8, p. 603–611, 2004.