LUCIANA DE ARAÚJO PIMENTA

EFEITO DA CROTOXINA NA AÇÃO MODULADORA DOS MACRÓFAGOS SOBRE EVENTOS DA NEOVASCULARIZAÇÃO. ENSAIOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

Luciana de Araújo Pimenta

Efeito da Crotoxina na Ação Moduladora dos Macrófagos Sobre Eventos da Neovascularização. Ensaios *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pimenta, Luciana de Araújo.
Efeito da crotoxina na ação moduladora dos macrófagos sobre eventos da neovascularização: ensaios *in vitro* / Luciana de Araújo Pimenta. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Mecanismos moleculares envolvidos nas ações de toxinas sobre processos fisiopatológicos.

Versão do título para o inglês: Crotoxin effect in modulating action of macrophages on neovascularization events: *in vitro* assays.

1. Crotoxina 2. Macrófagos 3. Célula endotelial 4. Matriz extracelular 5. Adesão 6. Migração I. Vessoni, Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana de Araújo Pimenta.

Título da Dissertação: Efeito da crotoxina na ação moduladora dos macrófagos sobre eventos da neovascularização: ensaios *in vitro*.

Orientador(a): Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas
Secretaria de Pós-Graduação
Edifício Biomédicas III
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415- CEP05508-900
Tel. (0xx11) 3091.7439 - Fax (0xx11) 3091.7423
E-mail: spgicb@usp.br
ICB

Programa: **FARMACOLOGIA**

Interessado(a): **LUCIANA DE ARAUJO PIMENTA**

Assunto: Solicitação para aceitação do Certificado emitido pela Comissão de Ética do Instituto Butantan em substituição ao da CEEA/ICB.

INFORMAÇÃO

A CPG/ICB, em reunião realizada a **10/03/2015**, após análise das justificativas apresentadas, bem como manifestação favorável da Comissão Coordenadora do Programa de Farmacologia, aprovou em caráter **extritamente excepcional** o pedido para aceitação do certificado emitido pela Comissão de Ética do Instituto Butantan, em substituição ao da CEEA/ICB.

Determinou ainda, que a referida decisão deverá ser anexada ao exemplar da Dissertação.

Encaminhe-se à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em **Farmacologia** para ciência dos interessados.

CPG/ICB, 10 de março de 2015

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Presidente

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da crotoxina sobre a ação moduladora dos macrófagos sobre eventos da neovascularização. Ensaio *in vitro*", **protocolo nº 1052/13**, sob a responsabilidade de Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni e Luciana de Araújo Pimenta - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 23/4/2014.

Vigência do Projeto: 05/2013 - 04/2015	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Fisiopatologia	30 ratos Wistar 45d - 170g (M) - **adicional**, 39 ratos Wistar 45d - 170g (M)	Adicional de animais

São Paulo, 25 de abril de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico o meu mestrado aos meus pais Victor Pimenta e Marly Almeida, que me deram todo amor, carinho, confiança desde o dia que fui concebida em suas vidas. Vocês são o motivo pelo qual luto todos os dias para continuar sempre em frente à vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me orientou para este caminho e o iluminou para que eu tivesse força para continuar, e por Ele não ter desistido de mim quando eu duvidei da fé, nos momentos difíceis e de angústia.

Aos meus pais Victor Pimenta e Marly Almeida por estarem ao meu lado em TODOS os momentos da minha vida, por confiarem e investirem em mim, e pelo apoio incondicional. Mamãe, seu amor, carinho, cuidado, seus afagos nos momentos de desespero e sua imensurável dedicação foi o que me deu em vários momentos, a esperança para seguir em frente. Papai, seu amor, carinho, até mesmo suas broncas, e principalmente sua presença significou segurança e certeza de que nunca estarei sozinha nesta longa jornada que chamamos de vida. Obrigada por serem meus melhores amigos. Amo vocês demais!

À minha orientadora Sandra Coccuzzo Sampaio Vesssoni, pela atenção, carinho, lições de vida e por ter me oferecido uma escada. Que escada? Ela me foi oferecida no primeiro dia que nos vimos, e a proposta era de que a escada você daria, mas cabia a mim subir ou não! Eu subi os degraus da iniciação científica, subi os degraus do mestrado e quero continuar subindo vários outros degraus até o quanto Deus permitir. Você não é apenas a minha orientadora, mas uma excelente profissional a quem sempre me inspiro todos os dias!

Aos meus padrinhos Sandra Alvarenga e Ubiratan Alvarenga, que mesmo estando longe, sempre procuraram saber notícias de sua afilhada, e por terem estendido a mão em momentos de dificuldade. Nunca esquecerei esta atitude de vocês!

Ao meu namorado Matheus Costa Cabral, que apesar de não acompanhar o meu mestrado desde o começo e não estar presente fisicamente sempre, me confiou seu coração e sua alma para que estes estejam comigo na alegria e na tristeza. Te amo!

À minha co-orientadora Maria Cristina Cirillo, por compartilhar suas experiências de vida, pelas inúmeras correções, pela colaboração no projeto, e por todo o apoio.

À Maíra Estanislau Soares de Almeida, obrigada pela disposição em compartilhar os seus conhecimentos, pela paciência, e por me auxiliar nas diversas técnicas e cálculos do Time Lapse de sete cabeças.

Ao Professor Mário Costa Cruz, pela paciência, pela disponibilidade em nos ajudar e pelo apoio técnico em diversos experimentos.

A todos os alunos do Laboratório de Fisiopatologia, em especial a Camila Neves, Marisa Bretones e Isabelle Valle que me ensinaram, assim como a citação de Oscar Wilde, que "A vida é muito importante para ser levada a sério".

Às secretárias do Departamento de Farmacologia do ICB, Mônica Nunes, Mirian Anraku e Camila Trindade, e à secretária do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, Neusa Picon por todo apoio técnico, pelo auxílio e pela disposição em sempre ajudar.

À Monica da Silva Amaral, do Setor de Tratamento de Monografias do ICB, pela paciência, auxílio e correção da dissertação.

Aos colaboradores do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan e do Departamento de Farmacologia do ICB/USP, obrigada pelo suporte técnico.

Ao apoio financeiro do CNPq, INCTTOX e FAPESP (bolsa: 2013/17190-7 e auxílio: 2012/51241-5).

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, fica o meu MUITO OBRIGADA!

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver".

(Martin Luther King)

“Toda história tem um fim, mas na vida todo final é apenas um novo começo”.

(Filme Grande Menina Pequena Mulher)

RESUMO

PIMENTA, L. A. **Efeito da Crotoxina na ação moduladora dos macrófagos sobre eventos da neovascularização. Ensaios *in vitro*.** 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crotoxina (CTX), toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeito supressor sobre o crescimento tumoral, além de acarretar ação imunomodulatória, particularmente sobre a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a CTX estimula a capacidade secretória de macrófagos peritoneais obtidos de animais portadores de tumor de Walker 256 no flanco superior. Esse aumento é acompanhado por significativa diminuição da massa tumoral. Adicionalmente, ensaios *in vitro*, demonstraram que macrófagos previamente tratados com CTX inibem a proliferação de células tumorais, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, secreção de IL-1β e a geração da LXA_4 e 15-epi-LXA_4. Além da ação sobre a proliferação de células tumorais, os macrófagos também influenciam em outros eventos do processo tumoral, como por exemplo, a neovascularização. Assim, considerando a ação imunomodulatória da CTX, a importância central do macrófago na gênese e progressão tumoral e a participação desta célula no microambiente estromal, o objetivo geral do presente projeto foi investigar se a atividade secretória de macrófagos tratados com CTX interfere nos eventos-chave da neovascularização, tais como a adesão, migração e proliferação de células endoteliais. Para tanto, macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de ratos machos da linhagem Wistar. Esses macrófagos foram aderidos e tratados com CTX (0,3µg/mL), por 2 horas e, em seguida incubados em meio fresco por 24 horas. Após esse período, macrófagos tratados com CTX ou sobrenadantes obtidos dessas células foram adicionados às culturas de células endoteliais tímicas (t.End.1) e os seguintes parâmetros, utilizando modelo de angiogênese *in vitro*, foram avaliados: 1) a capacidade proliferativa das células endoteliais; 2) o comportamento de adesão da célula endotelial aos seus ligantes naturais (colágeno tipo I-10µg/mL, fibronectina-3µg/mL e laminina-10 µg/mL); 3) a migração da célula endotelial sobre colágeno tipo I (10 µg/mL), utilizando os métodos de *Wound healing* e *Time Lapse*; 4) a formação de vasos induzidos em matrigel, no modelo 3D; 5) a liberação de VEGF e TNF-α, por macrófagos, por meio de ensaio imunoenzimático (EIA) e 6) o envolvimento de receptores peptídeo formil (FPRs) nas ações dos macrófagos sobre a proliferação e adesão de células endoteliais. Tanto os macrófagos tratados com CTX, como seus sobrenadantes inibiram a proliferação, adesão e o número de células migradas, bem como a velocidade de migração das células t.End.1 e, consequentemente, a formação de tubos no matrigel 3-D, acompanhadas pela diminuição da concentração de VEGF e TNF-α nos sobrenadantes de macrófagos tratados com a CTX. Ainda, o bloqueio dos receptores peptídeo formil aboliu as atividades inibitórias dos macrófagos tratados com a toxina, evidenciando a importância destes receptores para a ação da CTX sobre a atividade antiangiogênica de macrófagos.

Palavras-chave: Crotoxina. Macrófagos. Célula endotelial. Matriz extracelular. Adesão. Migração.

ABSTRACT

PIMENTA, L. A. **Crotoxin effect in modulating action of macrophages on angiogenesis. In vitro assays.** 2015. 80 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crotoxin (CTX), the main component of *Crotalus durissus terrificus* snake venom has suppressive effect on tumor growth and immunomodulatory action, particularly on the macrophages function, key cells to the mechanisms of innate defense. Studies by our group have shown that CTX stimulates the secretory capacity of peritoneal macrophages obtained from tumor-bearing rats. This increase is accompanied by a significant tumor mass decrease. In addition, *in vitro* assays demonstrated that macrophages pretreated with CTX inhibit the tumor cells proliferation in co-culture model, mediated, in part, by H_2O_2 release and NO production, IL-1β secretion and LXA_4 and 15-epi-LXA_4 generation. Besides the action on the tumor cells proliferation, macrophages influence also on other events of tumor process, such as neovascularization. Thus, considering the immunomodulatory action of CTX, the pivotal importance of macrophages in the genesis and tumor progression and participation of this cell in the stromal microenvironment, the objective of this project was to investigate the macrophages secretory activity treated with CTX on key events involved in the neovascularization such as the adhesion, migration and proliferation of endothelial cells. To this end, resident peritoneal macrophages were obtained from male Wistar rats. These macrophages were adhered and treated with CTX (0.3µg/mL) for 2 hours and then incubated in fresh medium for 24 hours. After this period, macrophages treated with CTX and supernatants from these cells were added to thymic (t.End.1) endothelial cells cultures, and the following parameters, using *in vitro* angiogenesis model were evaluated: 1) the proliferative capacity of the cells endothelial; 2) the endothelial cell adhesion behavior to their natural ligands (type I collagen-10ug/ml, fibronectin-3µg/ml and laminin-10µg/ml); 3) endothelial cell migration on type I collagen (10 ug/ml) using the methods Wound healing and Time Lapse; 4) formation of capillary-like tube formation on matrigel-3D matrix; 5) VEGF and TNF-α release and 6) the involvement of the formyl peptide receptors (FPR) in the macrophages actions on the proliferation and adhesion of the endothelial cells. Both macrophages treated with CTX as their supernatants inhibited proliferation, adhesion and the number of migrated cells as well as cell migration velocity, evaluated in Time Lapse. Consequently, there was inhibition of the capillary-like tube formation on matrigel-3D matrix, accompanied by VEGF and TNF-α secretion decrease in the macrophage supernatant treated with CTX. Further, the FPRs blockade abolished the inhibitory activity of the macrophages treated with the toxin, suggesting the importance of these receptors to the action of CTX on the macrophages antiangiogenic activity.

Keywords: Crotoxin. Macrophages. Endothelial cell. Extracellular matrix. Adhesion. Migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de cristal do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (isoforma CA_2CB_b) 18

Figura 2: Representação esquemática das diferentes etapas de migração celular em substratos 2D 23

Figura 3: Macrófagos na Angiogênese Tumoral 27

Figura 4: Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com diferentes concentrações de CTX sobre a proliferação de células endoteliais 43

Figura 5: Efeito da atividade secretora de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a proliferação de células endoteliais 44

Figura 6: Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com CTX sobre a adesão de células endoteliais (t.End.1) em diferentes ligantes da matriz extracelular 47

Figura 7: Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com a CTX e do sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a migração de células endoteliais, avaliada sobre o número de células migradas 49

Figura 8: Efeito do sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a distância das margens do rompimento da monocamada de células endoteliais 50

Figura 9: Efeito dos sobrenadantes de macrófagos tratados com CTX sobre o comportamento migratório das células endoteliais (t.End.1) em colágeno I, avaliadas em Time-Lapse 52

Figura 10: Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-incubados com a CTX a formação de estruturas do tipo tubulares no matrigel 3D 55

Figura 11: Efeito da CTX sobre a liberação de MMP-2, MMP-9, VEGF e TNF-α por macrófagos 57

Figura 12: Efeito do Boc-2 sobre ação inibitória de macrófagos tratados com a CTX na proliferação e adesão das células endoteliais 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e suas toxinas isoladas 17
1.2 Estudos experimentais sobre os efeitos antitumoral e imunorregulatório da CTX 19
1.3 Angiogênese tumoral – Aspectos Gerais 21
1.4 Características gerais dos Macrófagos 24
1.5 Macrófagos, Angiogênese e Microambiente Tumoral 25
1.6 Modelos experimentais para o estudo da interação entre células 29
2 JUSTIFICATIVA 31
3 OBJETIVO 32
4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 Obtenção da Crotoxina (CTX) 33
4.2 Obtenção de macrófagos peritoneais 33
4.3 Linhagem de células utilizada 33
4.4 Procedimento Experimental 34
4.5 Tratamentos Farmacológicos 35
4.5.1 Incubação com CTX 35
4.5.2 Incubação com Boc-2, antagonista de receptor para peptídeo formil e ensaio de co-cultura 36
4.6 Ensaio de proliferação 36
4.7 Ensaio de adesão da célula endotelial ao ligante natural 36
4.8 Ensaio de migração 37
4.8.1 Modelo de Wound healing 37
4.8.2 Modelo de Wound healing em *Time Lapse* 38
4.8.3 Ensaio de migração Time-Lapse in Long Time 38
4.9 Formação de vasos tipo-capilares em matrigel. Ensaio *in vitro* em 3D 39
4.10 Quantificação de TNF-α, VEGF, MMP-2 e MMP-9 40
4.11 Análise estatística 40
5 RESULTADOS 41
5.1 *A capacidade proliferativa das células endoteliais da linhagem t.End.1 induzida por macrófagos tratados com a CTX* 41
5.1.1 Determinação da concentração da CTX 41
5.1.2 Cultura de células endoteliais na presença macrófagos tratados com CTX ou de sobrenadantes obtidos dessas mesmas células 41
5.2 *A adesão de células endoteliais (t.End.1), sobre diferentes componentes da matriz extracelular, após cultura em sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos pré-tratados com CTX* 46

5.3 ***A migração de células endoteliais (t.End.1) induzida por macrófagos tratados com CTX ou por seus sobrenadantes*** 48

5.4 ***Efeito dos sobrenadantes obtidos de monocultura de macrófagos pré-tratados com CTX sobre o comportamento migratório de células endoteliais (t.End.1) em colágeno I, avaliado em Time-Lapse*** 51

5.5 ***Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com CTX sobre a formação de tubos em matrigel 3D*** 54

5.6 ***Efeito da CTX sobre a secreção de fatores angiogênicos por macrófagos*** 56

5.7 ***Envolvimento do receptor para peptídeo formil (FPR), ligante da LXA4, na ação inibitória dos sobrenadantes de macrófagos tratados com a CTX sobre a função da célula endotelial*** 58

6 DISCUSSÃO 60

7 CONCLUSÃO 67

REFERÊNCIAS 68

1 INTRODUÇÃO

Os venenos animais contêm grande variedade de toxinas, em sua maioria peptídeos e proteínas, que são utilizadas para a captura de presas e como defesa. Ainda, são constituídos por misturas complexas de substâncias inorgânicas e orgânicas. Os constituintes inorgânicos incluem cálcio, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobre e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971). Os componentes orgânicos são representados principalmente por proteínas com propriedades enzimáticas, peptídeos biologicamente ativos e algumas moléculas não-proteicas que agem isolada ou sinergisticamente, interferindo em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos (LEE, 1979). Alguns destes componentes do veneno possuem vários efeitos tóxicos, sendo assim denominados toxinas, e estas são responsáveis por diversos efeitos biológicos, como distúrbios na coagulação sanguínea, hemólise, hemorragia local e sistêmica, hipertensão, efeitos neurotóxicos, necrose tecidual, entre outros (IWANAGA; SUZUKI, 1979; MARKLAND, 1998; TANEN et al., 2001; WALTER; BILDEN; GIBLY, 1999).

Apesar da sua toxicidade, vários trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de venenos de serpentes para o tratamento de diferentes patologias. Isto se deve ao fato de milhões de anos de evolução terem conferido a estas substâncias, duas características importantes para o desenvolvimento de um fármaco: especificidade e seletividade a seus alvos (celulares e moleculares, como canais iônicos, receptores, enzimas, membranas celulares ou vias metabólicas) (BAILEY; WILCE, 2001; CURY; PICOLO, 2006; LEWIS; GARCIA, 2003).

Desta forma, as toxinas animais se constituem em importantes ferramentas para o estudo das propriedades fisiológicas e farmacológicas destes alvos e para a compreensão de como a disfunção destes alvos podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças. Adicionalmente, estas toxinas, em decorrência de sua seletividade ou mesmo especificidade pelos seus alvos, são modelos importantes para o desenho de novos e eficazes agentes terapêuticos. Proteínas obtidas de veneno de serpentes são amplamente estudadas em diferentes áreas das Ciências da Vida. Interações diretas destes compostos com diferentes tipos celulares envolvem diversos mecanismos que resultam em ativação ou bloqueio de diversas funções fisiológicas celulares.

No início da década de 30, do século passado, foi relatado o emprego de venenos ofídicos como analgésicos, mostrando a eficácia do veneno de *Naja tripudians* e *Naja naja* em diminuir a dor de pacientes portadores de carcinoma e em retardar a evolução de algumas

neoplasias (MONAELESSER; TAGUE, 1933[*], apud on (BRAZIL, 1950). Estes trabalhos repercutiram no meio médico brasileiro e nesta mesma década, estudos clínicos utilizando doses homeopáticas do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foram iniciados em pacientes portadores de algias, principalmente de origem neoplásicas (BRAZIL, 1934, 1950).

1.1 Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e suas toxinas isoladas

O gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 7,5% dos acidentes ofídicos no Brasil (SINAN, 2013), sendo estes acidentes causados principalmente pela subespécie *Crotalus durissus terrificus*.

As manifestações clínicas do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus* são decorrentes particularmente, da atividade neurotóxica do veneno e são caracterizadas pelo aparecimento do chamado "*facies miastênico*" ou "*facies neurotóxico*", onde se observam ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (ROSENFELD, 1971). Além disso, em decorrência desta atividade neurotóxica, é observada também insuficiência respiratória (AMARAL; MAGALHÃES; DE REZENDE, 1991; ROSENFELD, 1971). Além desta atividade, o veneno destas serpentes possui atividades miotóxica e coagulante (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1988; NAHAS; MACFARLANE; DENSON, 1964; ROSENFELD, 1971;), induzindo o quadro de rabdomiólise generalizada e incoagulabilidade sanguínea (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 1987; SANO-MARTINS et al., 2001).

Apesar destes efeitos sistêmicos importantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (AMORIM; FRANCO DE MELLO; SALIBA, 1951; BRAZIL, 1934) e são relatados ainda, ausência de dor ou dor de pequena intensidade, seguida de parestesia local (ROSENFELD, 1971). Como citado acima, além de não causar dor, (BRAZIL, 1934, 1950) evidenciou que este veneno é capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado no início do século passado, no tratamento de algias de origem neoplásica.

As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina. A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotoxina (CTX), seu

[*] MONAELESSER; TAGUE. *Trailement des algies et des tumeurs, par el venin de cobra*. **Bull. De l'Acd. De Médicine**, p371, 1933

principal componente tóxico (BRAZIL, 1972), contribuindo com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total.

Isolada por (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938), a CTX teve a sua estrutura descrita por (FRAENKEL-CONRAT; SINGER, 1956) sendo uma β-neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: um ácido denominado crotapotina (CA) e uma base denominada fosfolipase A_2 (FLA_2-CB) (**Figura 1**). Corresponde a 60% do veneno total e seu peso molecular é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (BRAZIL, 1972; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; STOCKER, 1990).

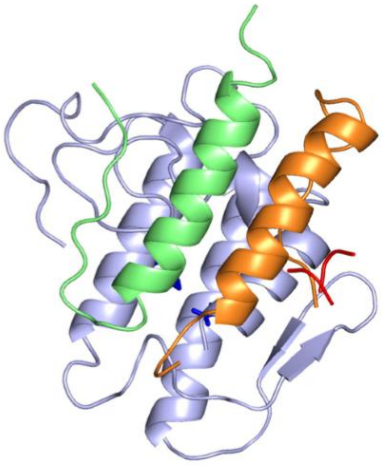


Figura 1. Estrutura de cristal do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (isoforma CA_2CB_b). Diagrama mostra a estrutura global do complexo CA_2CB_b. A subunidade CB_b básica (azul) é mostrada na orientação frente-face canônica do grupo estruturas IIA PLA_2. As cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto α, β e γ da subunidade ácida CA_2 são mostradas em laranja, verde e vermelho, respectivamente. A cristalografia mostra uma estrutura de suporte único da associação de suas subunidades. As duas principais hélices da subunidade CA_2 do complexo Crotoxina apresentam giro de 180° em relação ao eixo principal e canônica orientação face-frontal da subunidade CB (Faure, Xu e Saul, 2011).

A subunidade CB ou FLA_2 apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7, sendo constituída por uma cadeia única polipeptídica contendo 122 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfídicas. A subunidade CA (crotapotina) apresenta seu peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica. Foi demonstrado, por meio de estudos de caracterização e sequenciamento, que essa subunidade é formada por três cadeias polipeptídicas, α (39 resíduos), β (35 resíduos) e γ (14 resíduos), totalizando 88 resíduos de aminoácidos, unidas por sete pontes dissulfídicas (AIRD et al., 1986; FAURE; XU; SAUL, 2011).

A CTX exerce seu efeito por meio da associação da fração FLA_2 aos seus alvos, levando à dissociação ao complexo, onde CA permanece em solução, enquanto CB interage com seus aceptores. Foram realizados estudos com intuito de compreender a ligação da CTX às membranas pré-sinápticas, e esclarecer a participação da subunidade CA. Délot e Bon (1992) observaram que CA participa temporariamente da etapa na qual CB se associa com seu aceptor na membrana, formando um complexo ternário transitório. A subunidade CA só se dissocia de CB após o acoplamento irreversível deste componente ao aceptor na membrana das terminações nervosas.

Apesar da função de CA não estar totalmente evidenciada, é aceito que ela pode agir como uma molécula carreadora potencializando a atividade letal de CB, porém sua atividade enzimática diminui dentro do complexo CTX (BON et al., 1989; CHOUMET et al., 1996; SANTOS et al., 2007). Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no VCdt ou na fração CTX. Esta fração possui maior atividade enzimática que o complexo CTX, porém com menor toxicidade, uma vez que maiores doses de CB, comparada com CTX ou veneno, são necessários para bloquear a transmissão neuromuscular (CHOUMET et al., 1996).

Vale ressaltar que foram identificados 16 diferentes isoformas da CTX, resultantes de uma associação aleatória de quatro isoformas de CA (CA_1, CA_2, CA_3 e CA_4) e quatro isoformas de CB (CBa_2, CB_b, CB_c e CB_d), e as combinações destas isoformas determinam a formação de diferentes complexos, responsáveis pelas propriedades farmacológicas e biológicas significativamente diferentes descritas para a Crotoxina (FAURE; XU; SAUL, 2011).

1.2 Estudos experimentais sobre os efeitos antitumoral e imunorregulatório da CTX

Vários estudos experimentais têm demonstrado que o VCdt ou a CTX, são capazes de modular as respostas inflamatória e imune (SAMPAIO et al., 2010).

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi demonstrada a ação antitumoral da CTX *in vivo*. Nestes estudos, o tumor foi induzido pela administração intraplantar, em ratos, de células do carcinoma de Walker 256. Em análises histopatológicas do coxim plantar de ratos tratados com a CTX, observou-se a diminuição do tamanho do tumor acompanhada por uma diminuição da formação de neovasos, sugerindo que esta toxina possa interferir com a neovascularização na vigência do tumor (BRIGATTE et al., manuscrito em elaboração). Em continuidade à caracterização da ação antitumoral da CTX, em ensaios *in vitro*, foi observada

a ação inibitória da toxina sobre eventos fundamentais da progressão tumoral, agindo diretamente sobre as células tumorais LLC WRC 256, linhagem correspondente ao tumor de Walker 256, inibindo a proliferação, adesão da célula tumoral à fibronectina, além de inibir a polimerização dos filamentos de actina e proteínas sinalizadoras da família das GTPases Rho, tais como a RhoA e a quinase FAK nestas células (FAIAD; DELLA-CASA; SAMPAIO, 2008). Da mesma forma que observado para as células tumorais, a CTX age diretamente sobre a função de células endoteliais, inibindo a proliferação, a adesão celular aos seus ligantes naturais, tais como colágeno I, fibronectina e laminina. Além disso, a formação de tubos no matrigel 3-D, a migração celular avaliada no modelo de cicatrização (*wound healing*) e quimiotaxia, tanto na presença de meio de cultura, como no meio condicionado de célula tumoral (KATO et al., 2013).

Ainda em relação aos mecanismos envolvidos com a ação antitumoral da CTX, nosso grupo investigou a ação desta toxina sobre a função modulatória de macrófagos durante a progressão tumoral. Nestes estudos, as células tumorais de Walker 256 foram injetadas no flanco de ratos e, após o surgimento da massa tumoral (5º dia da injeção das células tumorais), a injeção subcutânea da CTX restabelece a atividade secretória dos macrófagos peritoneais, uma vez que esta é reduzida pelo tumor. Neste sentido foi observado que a CTX aumenta a capacidade destas células em secretar mediadores pró-inflamatórios, tais como NO, H_2O_2 e citocinas, e tornando-as funcionalmente semelhantes aos macrófagos *M1* (inflamatórios). Estas alterações foram acompanhadas do incremento do metabolismo, induzido pela CTX sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e citrato sintase) e da oxidação de glicose e glutamina. Estas ações estimulatórias da CTX sobre a função e metabolismo de macrófagos são de longa duração, pois foram observadas por até 14 dias após a administração de uma única dose da toxina, acompanhadas de significativa inibição do crescimento do tumor (FAIAD, 2012).

Em continuidade a esse estudo, ensaios *in vitro*, aonde macrófagos tratados com CTX e co-cultivados na presença das células tumorais da linhagem LLC WRC 256 foi observado aumento da produção de reativos do oxigênio (H_2O_2) e do nitrogênio (NO), e da secreção de IL-1β por macrófagos. Ainda, neste mesmo estudo foi observado aumento da produção de mediadores lipídicos Lipoxina A_4 e análogo mais estável 15-epi-LXA_4, que resultou no decréscimo da proliferação das células tumorais (COSTA et al., 2013).

Apesar destas evidências, até o momento, não foi demonstrada a importância da ação da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos no controle do desenvolvimento tumoral,

particularmente sobre a neovascularização, processo essencial para o crescimento e sobrevivência do tumor. Este estudo contribuirá de maneira importante para a caracterização dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral descrita para esta toxina.

1.3 Angiogênese tumoral – Aspectos Gerais

É bem estabelecido que a angiogênese, processo de formação de neovasos a partir da vasculatura existente é fundamental para o crescimento e metástase tumoral (FOLKMAN, 1992; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). A migração de células tumorais para tecidos distantes ocorre por meio de vasos sanguíneos e linfáticos, portanto, são os maiores componentes do microambiente tumoral (HE et al., 2005). A formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e vasos linfáticos (linfangiogênese) ocorre a partir de vasos pré-existentes estimulados por fatores pró-angiogênicos expressos pelo microambiente tumoral (FOLKMAN, 2007; ONIMARU; YONEMITSU, 2011).

No tumor, as células endoteliais vasculares (CEVs) proliferam de 50 a 100 vezes mais de cem células tumorais (DASS; TRAN; CHOONG, 2007). A angiogênese é um processo-chave no crescimento tumoral e necessário para a manutenção do tumor quando este está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm^3 (DVORAK, 1986). Este processo pode ser dividido em quatro etapas: 1) digestão de componentes da matriz extracelular e ativação de células endoteliais; 2) invasão e migração de células endoteliais; 3) proliferação de células endoteliais e 4) formação de tubos tipo capilares e diferenciação em vasos maduros. Estas etapas são moduladas por fatores derivados tanto das células tumorais quanto por células do microambiente tumoral e ainda são essenciais para a angiogênese associada à remodelagem e à nutrição do crescimento tumoral (DAVIS et al., 2005; ELICEIRI; CHERESH, 2001).

A adesão celular é um processo complexo, que envolve o contato inicial de uma célula a uma superfície, coordenado pela ligação do receptor ao ligante, pela polimerização da actina, e, finalmente, pelo estabelecimento de um estado de boa propagação celular (REINHART-KING, 2008). Esta interação é mediada pela ligação da integrina à matriz extracelular.

As integrinas são proteínas heterodiméricas, composta por subunidades α e β, associadas por ligação não-covalente, da superfície celular que reconhecem ligantes específicos da matriz extracelular (ELICEIRI; CHERESH, 1999; MIRANTI, 2002; NOGUERA et al., 2012). Essas proteínas não servem apenas para ancorar as células em suas

matrizes, mas também funcionam como transdutores de sinais químicos e mecânicos entre os ambientes intracelulares e extracelulares (MIRANTI, 2002).

Estudos focam na interação específica entre integrinas endoteliais com seus respectivos ligantes presentes na matriz extracelular, incluindo colágeno, laminina e fibronectina, sendo que estes componentes se ligam a subunidades de integrinas distintas (REINHART-KING, 2008). Demonstrou-se na **Tabela 1,** cada ligante, às diferentes integrinas.

Tabela 1. Integrinas das células endoteliais e ligantes

Integrin Subunits	ECM Ligands
$\alpha1\beta1$	collagen/laminin
$\alpha2\beta1$	collagen/laminin
$\alpha3\beta1$	laminin
$\alpha5\beta1$	fibronectin
$\alpha6\beta1$	laminin
$\alpha v\beta3$	vitronectin/fibronectin
$\alpha v\beta5$	vitronectin

Principais integrinas envolvidas na regulação dos processos de vasculogênese e angiogênese (Reinhart-King, 2008).

A adesão e migração celular têm sido extensivamente estudadas em sistemas de cultura de dimensional (2D) e descritas como processos de passos múltiplos (RIDLEY et al., 2003). Todos estes passos são um processo cíclico, com base na coordenação da adesão celular a matriz e a capacidade da célula para contrair o seu corpo de modo que ele possa se projetar.

Nestes eventos, a actina é o principal componente do citoesqueleto das células endoteliais, composto de subunidades globulares monoméricas (G-actina) de 43-kDa que se polimerizam em filamentos helicoidais (F-actina), estruturas fundamentais para a remodelação constante do citoesqueleto durante a migração, por meio da projeção de estruturas como filopódios e fibras de *stress.* As filopódias são projeções membrânicas que contêm longos filamentos de actina dispostos em feixes paralelos e próximos. Essas estruturas agem como sensores de estímulos de motilidade. Classicamente, a formação de filopódia é regulada por ativação da pequena GTPase Cdc42 que se associa com proteínas da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASPs). As lamelipódias são saliências citoplasmáticas que se formam na extremidade principal de espraiamento ou migração celular. Estas saliências são de

aproximadamente 1 a 5 µm de largura e cerca de 2 µm de espessura e estão associadas de forma importante com a polimerização de actina. As lamelipódias são coordenadas pela sinalização envolvendo a GTPases Rac e o complexo Arp2/3, provoca a nucleação a partir da extremidade (-), permitindo a rápida extensão da extremidade (+) e também pode se ligar à lateral de outro filamento de actina, dando origem a uma rede ramificada responsável pelo direcionamento dos filamentos de actina para sua ancoragem no citoesqueleto. Fibras de *stress* são filamentos de actina de polaridade invertida, ou seja, responsáveis pela atividade contrátil do citoesqueleto e são ligadas por α–actinina e miosina e distribuídas ao longo de fibras contráteis. Todas as 3 estruturas são essenciais para conduzir as várias etapas da motilidade associada à actina das células endoteliais, como demonstrado na **Figura 2**. Desta forma, considera-se que as funções de adesão celular e migração estão fortemente associadas (LADOUX; NICOLAS, 2012).

A migração celular pode ser representada e dividida em diferentes eventos: (1) detecção dos sinais pela filopódia; (2) formação e protrusão da lamelipódia e extensão para frente; (3) fixação das protrusões na matriz extracelular (MEC); (4) a contração mediada por *stress-fiber* do corpo celular para permitir que o progresso para frente; (5) liberação posterior, e (6) "reciclagem" da parte adesiva e sinalizadora da célula (LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007).

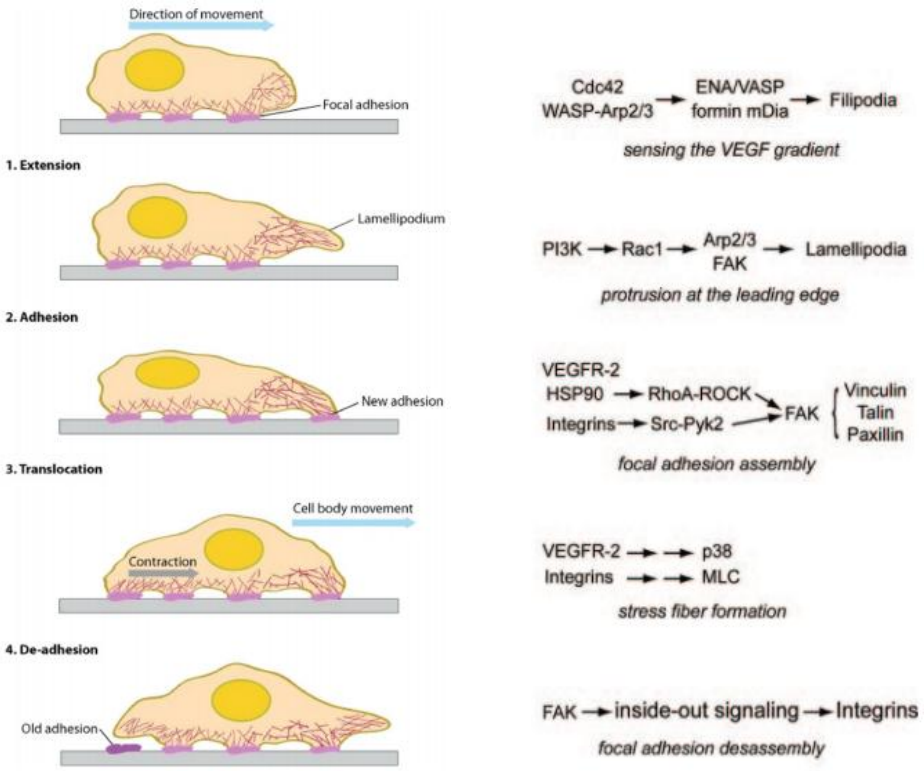


Figura 2. **Representação esquemática das diferentes etapas de migração celular em substratos 2D.** 1. Polimerização de filamentos de actina em projeção para a migração, traduzido em vigor protrusivo. 2. As protrusões da membrana facilitam a ligação de receptores transmembrânicos da superfície celular aos componentes de substrato. Novas aderências são rapidamente ligadas à rede de filamentos de actina. 3. A atividade combinada entre movimento retrógrado da actina e forças contráteis produzidos pelas fibras de estresse gera tensão para puxar o corpo da célula para frente. 4. As forças produzidas pela rede contráctil combinada com filamentos de actina e desarranjo das adesões focais ajudam a retrair a borda da célula em migração. Imagem cortesia do Instituto Mechanobiology, Universidade Nacional de Singapura. Por Ladoux and Nicolas, em Rep. Prog. Phys. (75), 2012 e Lamalice et al., em Circ Res. (30), 2007, Review.

Durante a angiogênese tumoral, os vasos organizam-se em uma rede de capilares e adquirem suas características estruturais e funcionais (CUENOD et al., 2006). Este processo de neovascularização é dependente de um delicado balanço entre fatores angiogênicos e antiagiogênicos secretados tanto por células tumorais, células endoteliais, bem como outras células estromais, tais como macrófagos (GOMES et al., 2013).

Diversos trabalhos apontam a relevância dos estudos que demonstram como a população celular estromal pode afetar a angiogênese e a linfangiogênese tumoral, uma vez que a interação entre as células estromais, tais como, linfócitos, células dendríticas, macrófagos com células tumorais é crucial para o estabelecimento e desenvolvimento tumoral (POLYAK; HAVIV; CAMPBELL, 2009).

1.4 Características gerais dos Macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de (MACKANESS, 1970), a atividade secretória desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (MOORE; METCALF; 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (VAN FURTH, 1989), a partir da célula precursora para monócitos e neutrófilos, a CFU-GM (*colony-forming unit, granulocyte-macrophage*) (METCALF, 1971). A primeira célula da linhagem monocítica na medula óssea, morfologicamente, é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (VAN FURTH; DIESSELHOFF-DEN DULK; 1970; VAN FURTH et al., 1980). O pró-monócito, ao se dividir, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, e a seguir passam para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, onde permanecem por cerca de 70 horas no homem (WHITELAW, 1966) e 25 horas, no camundongo (VAN

FURTH; COHN, 1968). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, onde se diferenciam em macrófagos. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisozima, proteinases neutras e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (COHN, 1978; TAKEMURA; WERB, 1984).

O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (VAN FURTH; COHN, 1968) e é considerada uma célula terminal, sem capacidade de proliferação (GORDON, 1986), embora em algumas ocasiões, tal fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (TARLING; LIN; HSU, 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (VAN FURTH; DIESSELHOFF-DEN DULK; MATTIE, 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por processo de diferentes estágios de ativação (COHN, 1978; GORDON, 1986; NATHAN, 1987; WERB et al., 1986), definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (ADAMS, HAMILTON, 1984). Exemplos de funções complexas incluem a quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígeno, lise de parasitas intracelulares e capacidade tumoricida (MANTOVANI et al., 2002).

1.5 Macrófagos, Angiogênese e Microambiente Tumoral

Em tumores sólidos, principalmente em carcinoma, as lesões primárias e as metástases são infiltradas por grande quantidade de leucócitos, tais como linfócitos T (helper, supressor e citotóxico), células B, *natural killer* (NK) e, principalmente por macrófagos os quais correspondem aproximadamente 80% do total de células associadas ao tumor (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; SIVEEN; KUTTAN, 2009; WANG et al., 2006). Durante o desenvolvimento do tumor, diferentes subpopulações de macrófagos foram identificados dentro de uma massa tumoral, uma vez que fatores quimiotáticos derivados de células neoplásicas recrutam monócitos circulantes que se localizam em diferentes nichos do tumor (LEWIS; POLLARD, 2006). Essas células atraem um recrutamento de novos monócitos circulantes ativados, que amplificam as subpopulações de macrófagos no ambiente tumoral (VAN OVERMEIRE et al., 2014). Dentre estas, estão *Macrófagos Associados ao Tumor*

(*tumor-associated macrophages*-TAMs) que suportam a progressão tumoral e metástase, à medida que secretam fatores de crescimento pró-angiogênicos (RAHAT; HEMMERLEIN, 2013) e ainda, contribuem com o suprimento de nutrientes, troca gasosa e eliminação de metabólitos. Outro subconjunto são os TEMs (*Tie-2 expressing monocytes*), que ao contrário de TAMs residem muito perto de vasos sanguíneos (VENNERI et al., 2007), mas são semelhantes aos TAMs em relação a secreção de fatores pró-angiogênicos.

Experimentalmente foi demonstrado que a instalação do tumor no tecido subcutâneo induz o recrutamento de monócitos circulantes para o microambiente tumoral. Este recrutamento está associado ao declínio do número de macrófagos da cavidade peritoneal, decorrente da migração destas células para o sítio tumoral instalado no subcutâneo, o que demonstra que esta cavidade é uma importante rota para o tráfego de macrófagos ativados que migram para o sítio tumoral, controlando seu desenvolvimento (BHAUMIK et al., 2001).

Em relação à neovascularização tumoral, estudos recentes demostraram que a interação entre células tumorais e TAMs intensifica as funções de adesão e migração das células endoteliais e, consequentemente, a formação de tubos, promovendo assim a progressão tumoral (WANG et al., 2013, ZHANG et al., 2012). Este complexo processo está representado pela **Figura 3,** proposta por (LEE; LIU; HUANG, 2006).

Estas células podem ser fenotipicamente, polarizadas em dois estágios distintos: o macrófago *M1* (ou *ativados classicamente*) que podem induzir a morte da célula tumoral (citotoxicidade ou apoptose) e/ou em macrófago *M2* (ou tipo II, *ativados alternativamente*), que podem estimular a capacidade invasiva das células tumorais (GORDON; TAYLOR, 2005; MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004).

O fenótipo M1 é comumente encontrado nas infecções e na inflamação crônica, sendo, portanto, pró-inflamatório. Esta célula é caracterizada pela liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF-α, reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e dos reativos intermediários do oxigênio (ROI). No contexto do tumor, os macrófagos M1 inibem o crescimento tumoral, erradicando as células tumorais e estimulando a resposta imune. Por outro lado, os macrófagos M2, encontrados quando o tumor está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm^3 e a angiogênese torna-se necessária para sua manutenção (DVORAK, 1986). Neste contexto, os macrófagos M2 contribuem para a progressão do tumor por produzir mediadores pró-angiogênicos e mediadores anti-inflamatórios, além de proteases e fatores de crescimento (GORDON, 2003; LAMAGNA; AURRAND- LIONS; IMHOF, 2006; MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004; POLLARD, 2004; SICA et al., 2008).

Ainda, mudanças no metabolismo de glicose e glutamina dos macrófagos são fundamentais tanto para determinar o seu estado funcional e de ativação, quanto para alterarem as funções de outras células do microambiente tumoral (BISWAS; MANTOVANI, 2012), tais como as células endoteliais (MANTOVANI et al., 2013).

O estresse hipóxico na massa tumoral acarreta a expressão aumentada de moléculas inflamatórias (FOLKMAN, 1985), responsáveis tanto pelo recrutamento de outros macrófagos, como pela polarização destas células para o fenótipo M2 (angiogênicos).

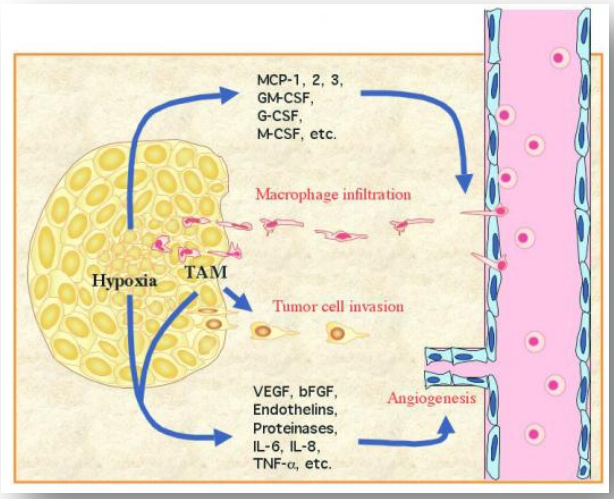


Figura 3. Macrófagos na Angiogênese Tumoral. O infiltrado de macrófagos facilita a propagação tumoral por induzir a angiogênese tumoral e invasão de células tumorais. Quando um tumor sólido cresce mais do que 2 mm^3 de diâmetro, a simples difusão de oxigénio e nutrientes aos tecidos metabolizantes torna-se insuficiente. A presença de múltiplas áreas de hipóxia se torna uma característica comum de tumores sólidos. Muitos fatores são produzidos a partir das áreas de hipóxia. Os monócitos são então recrutados continuamente para dentro do tumor, diferenciados em TAM, e, em seguida, se acumulam nas áreas hipóxicas. Eventualmente, TAMs funcionam como o fornecedor de fatores tumorigênicos, e que auxiliam no crescimento tumoral, bem como VEFG, favorecendo a angiogênese. Esquema proposto por Lee, Liu, Huang. *Tumor-Associated Macrophage: It's Role in Tumor Angiogenesis* in **J. Cancer Mol**. Vol 2(4), 2006.

Em relação à neovascularização tumoral, os TAMs produzem fatores angiogênicos (LEE; LIU; HUANG, 2006): fatores de crescimento para fibroblastos (FGF e FGF2); fatores estimuladores de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF); fatores de crescimento tumoral-β (TGF-β); fatores de necrose tumoral-α (TNF-α); fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros (TANAKA et al., 2002; UENO et al., 2000; WHITE et al., 2001).

Além desses mediadores, os TAMs secretam proteases derivadas, liberadas no tumor, principalmente serino-proteases, tais como ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (KOCH et al., 1992) e metaloproteases (MMPs), os quais facilitam a angiogênese tumoral.

As MMPs são uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular, representadas principalmente pela colagenase (MMP-1), gelatinase A (MMP-2), estromelisina (MMP-3), matrilisina (MMP-7) e gelatinase B (MMP-9) que em conjunto com a MMP-2 são as principais metaloproteases secretadas pelos TAMs (NAYLOR et al., 1994). Neste sentido, durante a progressão tumoral, a expressão dessas MMPs encontra-se aumentada no tumor, sendo os TAMs as maiores fontes de MMP-9, importantes para a intensificação da angiogênese, invasão e metástase tumoral (GRIMSHAW; WILSON; BALKWILL, 2002; KOCH et al., 1992; NAYLOR et al., 1994).

Descrita originalmente na década de 1970, como proteínas secretadas pelo tumor, potentes no aumento da permeabilidade microvascular, as proteínas da família VPF/VEGF são geralmente consideradas as mais importantes envolvidas no desenvolvimento da vasculatura e têm papéis essenciais na angiogênese e linfangiogênese durante os processos fisiopatológicos (BROWN et al., 1997; DVORAK et al., 1999).

O TNF-α, em conjunto com o VEGF e o TGF-β é uma das principais citocinas associadas à angiogênese tumoral, secretadas pelos macrófagos (KLIMP et al., 2002; LEE; LIU; HUANG, 2006). Esta citocina estimula a reparação, e pode tanto estimular o desenvolvimento de tumores, por meio de estímulo do crescimento de neovasos, como pode participar na destruição do tumor por citotoxicidade direta (LEIBOVICH et al., 1987).

Além de substâncias pró-angiogênicas, os macrófagos secretam, também, substâncias que inibem direta ou indiretamente o crescimento tumoral, tais como a lipoxina A_4 (LXA_4) e seu análogo estável (15-epi-LXA_4), mediadores lipídicos gerados na via da lipoxigenase. Esses mediadores apresentam importante ação inibitória sobre o crescimento tumoral (CALORINI et al., 2005) e a proliferação de células endoteliais (LEEDOM et al., 2010), além de suprimir fatores de crescimento angiogênicos e seus receptores, sendo, portanto, consideradas reguladores-chave da neoangiogênese tumoral (CLÀRIA, 2006).

As lipoxinas (LXs) foram identificadas por (SERHAN; HAMBERG; SAMUELSSON, 1984), em frações purificadas de suspensão de leucócitos. As LXs são rapidamente produzidas em resposta a diferentes estímulos e apresentam diversas bioatividades sobre leucócitos, estimulando a ativação de monócitos e macrófagos, os quais inibem a atividade de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Ainda, estes mediadores lipídicos modulam as atividades de células de origem não mielóides, incluindo fibroblastos, células endoteliais, epiteliais gastrointestinais,

mesangial renal e células dendríticas esplênicas (MCMAHON; GODSON, 2004). A LXA_4, bem como seus análogos naturais (ATLs), gerados a partir da acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2), na presença de aspirina ou outros substratos endógenos (citocromo P450 e espécies reativas de oxigénio), induz à formação estéreo-selectiva (40% de *R* e 60% da forma *S*) de lipoxinas 15-epi (15-Epi- LXA_4), que são mais potentes e mais estáveis do que a forma nativa LX contendo 15-S (CAPDEVILA et al., 1986; CLÀRIA, 2006; SPITE; CLÀRIA; SERHAN, 2014). Tanto a LXA_4 nativa quanto seus análogos estáveis exercem seus efeitos biológicos específicos após a ligação a receptores transmembranicos, os ALXR (conhecidos também como receptores para peptídeo formil - *Formyl Peptide Receptors-FPRs*), acoplados à proteína G, identificados em vários tipos celulares, dentre eles, os macrófagos (FIORE et al., 1994; CHIANG; SERHAN, 2006).

Em conjunto, muitos desses fatores são agentes-chaves na progressão tumoral e os macrófagos desempenham participação fundamental na modulação da secreção dos mediadores pró e anti-angiogênicos. Portanto, o melhor entendimento da regulação e da função dos macrófagos no *crosstalk* com as células tumorais pode contribuir para estabelecer novas alternativas imunoterapêuticas para o controle do desenvolvimento tumoral (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; SIVEEN; KUTTAN, 2009).

1.6 Modelos experimentais para o estudo da interação entre células

Nos ensaios experimentais, utilizando os modelos *in vivo* é essencial mimetizar as condições naturais possíveis envolvidas no ambiente celular. Neste sentido, ao escolher um modelo para a realização de experimento *in vitro* é imprescindível os cuidados com a observação, mensuração e a manipulação das células para que o sistema *in vitro* reproduza o comportamento celular observado no ambiente *in situ*. No modelo de co-cultura, diferentes tipos celulares são agregados em um mesmo ambiente, promovendo a comunicação celular, importante para a regulação da fisiologia e diferenciação dessas células. Esta comunicação pode ocorrer por diferentes maneiras: via sinalização *parácrina* (sinais liberados por uma célula ligada a receptores de membrana de outras células), via sinalização *justacrina* (sinais expressos na membrana de uma célula são reconhecidos por receptores de membrana de outras células), ou por *comunicação juncional* (gap) (trocas na sinalização intracelular) (HENDRIKS; RIESLE; VAN BLITTERSWIJK, 2007). Quando diferentes tipos celulares estão co-cultivados as células podem interagir e se comunicarem por essas diferentes vias, dependendo da proximidade e habilidade de interação ou comunicação.

Por meio de ensaios em co-cultura Hauptmann *et al.* (1993), investigaram as interações entre as células tumorais e diferentes subpopulações de macrófagos murinos. Nestes estudos, foi investigado o comportamento proliferativo e migratório de células tumorais quando co-cultivadas com as subpopulações de macrófagos. Outros estudos focaram a participação do macrófago na angiogênese tumoral e inflamação (ONO, 2008), e ainda demonstra a importância da mediação química, como por exemplo, a mediação secretada por macrófagos no controle das respostas inflamatória e angiogênica, sugerindo novos alvos para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico.

Recentemente, foi demonstrado que meio de cultura condicionado obtido de co-culturas de macrófagos com células tumorais intensifica a migração das células endoteliais, bem como a formação de tubos tipo-capilares, demonstrando que a interação de células tumorais com macrófagos pode afetar o potencial angiogênico das células tumorais (WANG et al., 2013).

Assim, considerando os diferentes estudos relatados na literatura, o modelo de co-cultura provou ser uma ferramenta *in vitro* fundamental para elucidar a importância de interações celulares na fisiologia, homeostasia, reparo e regeneração tecidual e a gênese e desenvolvimentos de diversas doenças, tais como o câncer (HENDRIKS; RIESLE; VAN BLITTERSWIJK, 2007).

♣

2 JUSTIFICATIVA

A polarização e a plasticidade funcional dos macrófagos são fundamentais na progressão tumoral regulando, particularmente, a angiogênese, processo de formação dos neovasos fundamental para a proliferação, sobrevida e invasão de células malignas. Estudos recentes demonstram importante ação modulatória da CTX sobre o metabolismo e, consequentemente, sobre as funções de macrófagos no controle do desenvolvimento tumoral. Portanto, ampliar os estudos que demonstrem a importância da ação da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos no controle do processo de neovascularização contribuirá de maneira importante para a caracterização dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral descrita para esta toxina. Ainda, favorecerá a utilização desta toxina como ferramenta científica para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos relacionados com o desenvolvimento tumoral.

3 OBJETIVO

Investigar a importância da atividade secretória de macrófagos acarretada pela CTX sobre os eventos-chave da neovascularização, tais como a adesão, migração e proliferação de células endoteliais.

Para tanto, células endoteliais tímicas (t.End.1) foram incubadas na presença de macrófagos previamente tratados com a CTX ou na presença de sobrenadantes obtidos desses macrófagos para avaliar:

1) eventos relacionados à formação de vasos, tais como:
   a) a capacidade proliferativa das células endoteliais;
   b) o comportamento de adesão da célula endotelial aos seus ligantes naturais, tais como colágeno I, fibronectina e laminina;
   c) a migração da célula t.End.1 em matriz extracelular, utilizando os métodos de *Wound healing* e *Time Lapse Long-Time*;
   d) a formação de vasos induzidos em matrigel, no modelo 3D;

2) a liberação de VEGF, MMP-2 e MMP-9, por meio de ensaio imunoenzimático (EIA).
3) o envolvimento de receptores peptídeo formil (FPRs) nas ações dos macrófagos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Crotoxina (CTX)

A CTX foi purificada a partir de veneno da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, liofilizado. O veneno foi extraído de vários exemplares de espécimes adultos, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e estocado a 20 °C. A purificação da fração CTX do veneno foi realizada segundo o método descrito por (RANGEL-SANTOS et al., 2004), pelo Prof. André Fonseca Alves, assistente técnico responsável do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

4.2 Obtenção de macrófagos peritoneais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso médio variando entre 160 a 180 gramas, mantidos no laboratório, com livre acesso a água e ração, por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2. Em seguida, a pele da região abdominal foi removida e 20 ml de PBS foram injetados na cavidade peritoneal. Após a massagem do abdômen, o fluído peritoneal foi colhido com o auxílio de pipeta Pasteur de polietileno. Os protocolos experimentais propostos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB no 1052/13).

4.3 Linhagem de células utilizada

Linhagem das Células endoteliais tímicas (t.End.1), derivada de endotelioma de timo de camundongo C57BL/6. Essas células foram estabelecidas como endotelial por (WILLIAMS; COURTNEIDGE; WAGNER, 1988), e são amplamente utilizadas como modelo experimental *in vitro* (BORASCHI et al., 1991; FRANCELINO, 2008; MENDES-DA-CRUZ et al., 2008; RAMOS, 2008). Amostras destas células foram mantidas em nitrogênio líquido e descongeladas e restabelecidas às condições de cultura, em garrafas pequenas próprias para cultivo, com meio de cultura RPMI contendo soro bovino fetal (SBF) a 10% e L-glutamina a 1%, na concentração de $5x10^4$/ml, em 10 ml de meio, em garrafa de cultura de $75cm^3$ em estufa a 37 °C e 5% de CO_2, por 72 horas. Após encontrar-se em estado de semi-confluência (80%), foram submetidas ao tratamento com tripsina/EDTA, para posteriormente serem utilizadas de acordo com o protocolo experimental desejado. O repique

das células foi realizado a cada 2 dias, utilizando tripsina 0,25% em PBS, por 5 minutos, em estufa a 37 °C, coletadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura fresco.

4.4 Procedimento Experimental

Para avaliar a capacidade de macrófagos tratados com a CTX em modular a função de células endoteliais, inicialmente foram utilizadas duas concentrações, baseados em ensaios *in vitro* anteriores, realizados com diferentes tipos celulares, tais como macrófagos (SAMPAIO et al., 2003), células tumorais (FAIAD; DELLA-CASA; SAMPAIO, 2008) e endotelial (KATO et al., 2013). Em um primeiro momento foi avaliada a capacidade proliferativa das células endoteliais, testando as duas concentrações de CTX, tanto em ensaios de co-cultura contato célula a célula, quanto em ensaios utilizando apenas os sobrenadantes destes macrófagos pré-tratados na presença das células endoteliais.

Uma vez que a migração celular é o componente essencial para a progressão tumoral, foram realizados ensaios de migração *in vitro*, utilizando o modelo do *Wound healing*, que avalia o movimento das células endoteliais em uma área vazia, criada por uma interrupção na monocamada de cultura de células endoteliais. A partir deste ensaio, apenas os sobrenadantes de macrófagos tratados com uma única concentração de CTX foram utilizados. Para complementação ao *Wound healing*, foi realizado ensaio em *Time Lapse* (*Long Time*), para acompanhar, em tempo real, o comportamento migratório das células endoteliais após incubação dos sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com a CTX ou apenas meio de cultura (controle). Este ensaio registra a cada 20 minutos, por 18 horas, o comportamento celular, sendo possível analisar a velocidade de deslocamento, a distância relativa (distância percorrida do ponto inicial ao ponto final, sem considerar o percurso total) e direcionalidade (relação entre distância relativa pela distância total). Ainda, o comportamento proliferativo das células endoteliais incubadas na presença dos diferentes sobrenadantes de macrófagos, tratados ou não com a CTX, foi avaliado por um período de 180 min, a partir das imagens geradas em tempo real, durante o ensaio do *Time Lapse*. Em continuidade aos objetivos propostos, levando em consideração que para que a migração ocorra é necessária a adesão da célula a componentes da matriz extracelular, as células endoteliais foram incubadas na presença do sobrenadante de macrófagos pré-tratados com CTX ou apenas meio de cultura e submetidas à adesão sobre o *coating* de colágeno tipo I, fibronectina e laminina. Os eventos de proliferação, migração e adesão estão envolvidos com a formação de neovasos. Portanto, a capacidade de formação de vasos pelas células endoteliais, na presença dos sobrenadantes de

macrófagos pré-tratados ou não com a CTX, foi avaliada em matrigel no modelo 3D. Para investigar a ação da CTX sobre a secreção de mediadores fundamentais envolvidos na angiogênese tumoral, os macrófagos foram tratados com a CTX e a concentração de MMP-2, MMP-9, VEGF e TNF-α foi quantificada do sobrenadante.

Finalmente, tanto os eventos como os mediadores angiogênicos podem ser inibidos por substâncias antiangiogênicas, tais como as LXs, mediadores lipídicos ligantes de receptores peptídeo formil. Considerando que a CTX é capaz de induzir aumento da secreção de LXA_4 e 15-Epi-LXA_4 por macrófagos e que FPRs são importantes para as ações da CTX sobre as funções e atividade secretória dos macrófagos em microambiente tumoral, o Boc-2, antagonista seletivo de FPRs, foi utilizado previamente à incubação dos macrófagos com a CTX para avaliar a importância desses receptores as ações dos sobrenadantes destas células sobre alguns ensaios funcionais de células endoteliais.

4.5 Tratamentos Farmacológicos

4.5.1 Incubação com CTX

Os macrófagos foram obtidos, conforme descrito no **item 4.2** e aderidos ($1x10^6$/mL) em placas de cultura de 6 poços, por 1 hora a 37 ºC e 5% de CO_2. Em seguida, foram lavados com PBS e incubados na presença de CTX (0,3 µg/mL - equivalente a 12,5 nM ou 1,2µg/mL - equivalente a 50 nM, em meio de cultura RPMI-1640) ou apenas na presença de meio de cultura (controle), por 2 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período de cultura, os macrófagos foram lavados novamente com PBS e incubados na presença de meio de cultura fresco, por 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este procedimento, foram realizados 2 protocolos: **a**) Para a realização de ensaio de co-cultura entre macrófagos e células endoteliais, após as 24 h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e as monoculturas de macrófagos foram incubadas na presença das células endoteliais ($5x10^5$ células/poço), por 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. **b**) Para a realização da cultura de células endoteliais com sobrenadante de macrófagos, após o período de 24 h, os sobrenadantes coletados das monoculturas foram centrifugados para a remoção de *debris* celulares e então incubados em cultura de células endoteliais, em diferentes períodos, para a realização dos diferentes ensaios experimentais. Esses protocolos foram baseados em estudos anteriores (COSTA et al., 2013; CHO et al., 2012; WANG et al., 2009; WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

4.5.2 Incubação com Boc-2, antagonista de receptor para peptídeo formil e ensaio de co-cultura

Os macrófagos foram obtidos, conforme descrito no **item 4.2** e aderidos por 1 h, a 37 ºC e 5% de CO_2. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas em garrafas de cultura de 75cm^3 na presença de 100 µM/mL de Boc-2, antagonista seletivo de FPR, por 15 minutos a 37°C (COSTA et al., 2013). Após este período, os macrófagos foram lavados com PBS e foi realizada a incubação com CTX (0,3µg/mL), por 2 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, as monoculturas foram lavadas e incubadas em meio de cultura fresco, por um período de 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, os sobrenadantes foram coletados para avaliar o envolvimento dos FPRs na ação inibitória da CTX sobre alguns eventos angiogênicos.

4.6 Ensaio de proliferação

As células endoteliais t.End.1 (5x10^5 células/poço) foram aderidas em placas de 6 poços, por 2 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após esse período, os poços foram lavados e adicionados os sobrenadantes obtidos de macrófagos ou suspenção de células t.End.1 (5x10^5) foram incubadas diretamente com os macrófagos, conforme descrito no **item 4.5.1**. Após 24 horas de cultura, os sobrenadantes foram retirados e as células endoteliais foram tripsinizadas, ressuspensas com PBS contendo corante azul de Tripan 1% e o número de células determinado em câmara de Neubauer, em microscopia de luz, conforme descrito por (HOTCHKISS et al., 2002). A viabilidade das células foi determinada pela técnica de exclusão por Azul de Tripan (1%).

4.7 Ensaio de adesão da célula endotelial ao ligante natural

Para este ensaio, uma suspensão de células t.End.1 (1x10^6/mL) foi previamente incubada, na ausência ou presença de sobrenadantes de macrófagos obtidos conforme **item 4.5.1**, por 24 horas, a 5% de CO_2 a 37 °C. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura sem soro e uma suspensão de células (100µL/poço) foi adicionada às placas Maxsorp (Nunc® Apogent Technologies, Portsmouth, United States), contendo 96 poços, previamente sensibilizados *overnight*, com os diferentes componentes de matriz [colágeno tipo I - 10µg/poço (MEEROVITCH et al., 2003); fibronectina - 3µg/poço (MEEROVITCH et al., 2003) e laminina - 10µg/poço (ZARIC, RÜEGG, 2005)], a uma

temperatura de 8 ^{o}C. Para assegurar que a adesão das células ocorreu em resposta ao reconhecimento da célula pelo componente da matriz, o controle negativo foi feito pela sensibilização de poços apenas com albumina (BSA 1%). No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS e 100µL de BSA 1% foram adicionados em todos os poços para bloquear os sítios inespecíficos. Após 1 hora de aderência, as células que não aderiram foram removidas dos poços por meio de duas lavagens consecutivas com PBS. As células aderidas foram incubadas com 100 µL de meio de cultura sem soro e 30 µL de MTT (5 mg/mL de PBS), por 3 horas. O corante MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide - Amresco®, Solon, Ohio, United States) é um substrato constituído por um composto tretazol de coloração amarela (forma oxidada), sendo convertido em um composto insolúvel formazan (forma reduzida) de cor azul escuro em células viáveis. Essa coloração é feita por desidrogenases mitocondriais. Em seguida, 100 µl de SDS 10%, dissolvido em água destilada (contendo 0,01M de HCl) foram adicionados em cada poço. As placas foram mantidas na estufa, por 18 horas a 37 ºC e 5% de CO_2, para que o precipitado seja solubilizado, permitindo sua quantificação por espectrofotometria, em comprimento de onda a 595 nm, em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). As curvas padrões foram construídas partindo-se das suspensões de células nas concentrações de 10^6 células/mL, utilizando número de células correspondentes a 100, 80, 65, 50, 35, 20µl dessa suspensão. Os experimentos foram realizados em octuplicatas. Os valores obtidos pela leitura da absorbância foram inseridos no programa GraphPad InSTAT; Software V2.01 para a obtenção do número de células finais aderidas.

4.8 Ensaios de migração

4.8.1 Modelo de Wound healing

Este ensaio é usado para avaliar o movimento de células no campo vazio criado por uma interrupção na monocamada de cultura de células (DENKER, BARBER, 2002). Para a obtenção de uma monocamada celular confluente, as células endoteliais da linhagem t.End.1 foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Desta suspensão, as células ($5{,}5x10^5$ células/1mL/poço) foram aderidas em placas de 24 poços, contendo lamínulas previamente revestidas com colágeno tipo I (10µg/100µL), por 1h, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, uma interrupção foi realizada utilizando uma ponteira de 200µL, com o objetivo de criar uma área livre de células. Para a obtenção do T0 (logo após a realização da

interrupção da monocamada), uma das lamínulas foi fixada e corada em corante Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). As demais lamínulas foram lavadas com PBS para a retirada das células desaderidas pela ponteira e, em seguida, incubadas na presença dos sobrenadantes obtidos conforme descrito no **item 4.5.1**. Simultaneamente, foi realizado o segundo protocolo, onde as células t.End.1 foram aderidas aos poços na presença de macrófagos previamente tratados ou não com 0,3µg/mL de CTX. Nesta condição, a proporção das células foi de 1:1 ($5x10^5$ células, de cada tipo celular), totalizando a monocamada confluente de $1x10^6$ células. Após a interrupção da monocamada, as lamínulas foram incubadas na presença de meio de cultura RPMI 1640. Em ambos os protocolos, o ensaio de migração foi realizado por 24 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, os sobrenadantes foram retirados e as lamínulas foram fixadas e coradas com corante Rosenfeld, retiradas dos poços da placa de cultura e montadas em lâminas com auxílio do Entelan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt, Germany). Pelo menos 5 campos distintos por lamínula foram fotografados em (Leica DFC 420 acoplada ao microscópio Olympus BX51, utilizando o software Image-Pro Plus 5.1). Para a contagem das células migrantes no campo induzido pela ponteira, nas imagens foram inseridas as réguas nas margens esquerda e direita do campo, baseando-se na imagem obtida na lamínula T0. Após a inserção das réguas, a contagem das células migrantes no campo foi realizada (DENKER; BARBER, 2002; DURHAM; HERMAN, 2009).

4.8.2 Modelo de Wound healing em *Time Lapse*

Para este ensaio, as células endoteliais da linhagem t.End.1 ($2,5x10^5$ células/poço) foram aderidas em placas TPP® (TPP – Techno Plastic Products AG, Switzerland) de 24 poços, previamente revestidas com colágeno tipo I (10µg/100µL), e incubadas *overnight*, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, uma interrupção foi realizada na monocamada utilizando uma ponteira de 200µL, com o objetivo de criar uma área livre de células. Em seguida, os poços foram lavados e as células foram incubadas na presença dos sobrenadantes obtidos no **item 4.5.1** e levadas ao CEFAP (Centro de Facilidades para a Pesquisa) para serem analisadas no sistema IN CELL Analyser 2200, por 24 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2, com auxílio do técnico responsável, o Prof. Mário Costa Cruz. A partir das imagens obtidas, em objetiva de 10x foi determinado o valor do espaçamento das margens do rompimento da monocamada após os diferentes tratamentos.

4.8.3 Ensaio de migração Time-Lapse in Long Time

Um importante aspecto da migração das células, não é apenas se elas são capazes de migrar, mas também o quão rápido elas migram. Entretanto, para o processo de cálculo da velocidade celular por meio da microscopia de *Time-Lapse* não é apenas levado em consideração a obervação da célula em t = 0 e depois a t = 1 h, mas também é avaliada a distância percorrida das células (REINHART-KING, 2008). A fim de obter valores numéricos de velocidade, é necessário fazer alguma trigonometria. Para cada célula, calcula-se a variação nas coordenadas X e Y de cada ponto de tempo em comparação com o ponto de tempo anterior. A distância percorrida pela célula entre imagens é estimada como a raiz quadrada da soma de $X^2 + Y^2$. Desta forma, a distância total percorrida por uma célula, durante um determinado período, pode ser estimada a partir das derivadas e da velocidade (distância = velocidade × tempo) (DANSON et al., 2007). Conforme descrito por (CHIRIELEISON et al., 2011), com um controle automatizado, de alto rendimento a técnica de *Time-Lapse* tornou-se uma plataforma ideal para experimentos de biologia celular com múltiplas variáveis e medições de parâmetros dependentes do tempo para rastrear milhares de células em um determinado experimento.

Para este ensaio, as células endoteliais da linhagem t.End.1 ($1x10^3$ células/poço) foram aderidas em placas TTP® de 24 poços, previamente revestidas com colágeno tipo I (10µg/100µL), e incubadas *overnight*, a 37 ºC e 5% de CO_2. Neste ensaio foi utilizada uma baixa concentração celular (na ordem de 10^3), por dois motivos importantes: 1) a avaliação dos parâmetros é feita unitariamente e 2) as células devem ter campo livre para a sua projeção, sem interferência do contato célula-célula, para que a análise seja validada. Após a adesão e o espraiamento, por 24 horas, as células foram incubadas na presença dos sobrenadantes obtidos no **item 4.5.1** e levadas ao CEFAP (Centro de Facilidades para a Pesquisa) para serem analisadas no sistema IN CELL Analyser 2200, por 18 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2, com auxílio do técnico responsável, o Prof. Mário Costa Cruz. A migração das células endoteliais foi avaliada por 18 horas, visando os parâmetros de velocidade, distância relativa e direcionalidade destas células. Além da análise desses parâmetros, foram selecionadas imagens de células endoteliais, correspondentes a um período de 180 min, a fim de avaliar a capacidade proliferativa das células endoteliais, incubadas nos diferentes sobrenadantes de macrófagos.

4.9 Formação de vasos tipo-capilares em matrigel. Ensaio *in vitro* em 3D

Placas de 96 poços foram mantidas em gelo e 60µL de matrigel (gelado) (Matrigel BD Biosciences®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, United States), foram adicionados por poço. As placas foram mantidas, por 40 min, a 37 ºC e 5% de CO_2, para a polimerização do gel. Em seguida, as células t.End.1 ($2,5x10^4$) foram plaqueadas em 50µL, em meio de cultura RPMI 1640 e em seguida 50µL dos sobrenadantes de macrófagos tratados ou não com a CTX (0,3µg/mL), obtidos conforme descrito no protocolo realizado n **item 4.5.1,** foram adicionados. Após 2 horas, as imagens foram capturadas e o número de estruturas foi quantificado por contagem de todos os ramos observados, em pelo menos seis campos aleatórios, conforme descrito por (WANG et al., 2009; WANG et al., 2013). As imagens foram capturadas em microscópio Nikon Eclipse TS100, equipado com uma câmera DS-Fi2, em objetiva de 10x, utilizando o software Nis-Elements D. Este equipamento fica locado no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

4.10 Quantificação de TNF-α, VEGF, MMP-2 e MMP-9

Macrófagos peritoneais ($1x10^6$) foram aderidos em placas de 6 poços e incubados em 1mL de meio RPMI com 10% de SFB, por um período de 1 hora. Após esta incubação, os poços foram lavados e tratados ou não com CTX (0,3µg/ml) por um período de 2 horas. Os macrófagos foram lavados com PBS após este período e incubados com 2 mL de meio RPMI com 10% de SFB na estufa a 37°C, por 24 horas. Todos os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -80 ºC, para determinação dos fatores. Para das dosagens de TNF-α, VEGF, MMP-2 e MMP-9, foram utilizados kits reagentes (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN e Abcam, discover more, C), por meio da técnica de ensaio imunoenzimático (EIA), de acordo com as técnicas padronizadas pelo fabricante. (Abcam, ab100730-MMP2 Mouse Elisa Kit, sensibilidade de 27,43 a 20.000 pg/mL, ab100732-MMP-9 Mouse Elisa Kit, sensibilidade de 74 a 18.000 pg/mL e ab100751 – VEGF Mouse Elisa Kit, sensibilidade de 4.1 a 1.000 pg/mL, R&D Systems RTA00-RAT TNF-α Immunoassay Quantikine Elisa, sensibilidade 5 pg/mL).

4.11 Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey-Kramer (INSTAT – GraphPad Software), comparando-se os valores do grupo controle com os valores dos experimentais. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $p<0,05$ (5%).

5 RESULTADOS

5.1 A capacidade proliferativa das células endoteliais da linhagem t.End.1 induzida por macrófagos tratados com a CTX

5.1.1 Determinação da concentração da CTX

Para este ensaio, inicialmente foi avaliada a concentração que seria capaz de alterar a atividade de macrófagos. Assim, baseados em estudos anteriores, os macrófagos foram incubados com CTX nas concentrações de 0,3µg/mL (COSTA et al., 2013) e 1,2µg/mL (KATO et al., 2013).

Conforme demonstrado na **Figura 4**, os macrófagos tratados com ambas as concentrações de CTX foram capazes de acarretar ação inibitória, de mesma magnitude (44 e 36%, respectivamente), sobre a proliferação das células endoteliais, quando comparadas ao grupo controle, composto por células t.End.1 incubadas com macrófagos previamente incubados apenas com meio de cultura RPMI 1640.

5.1.2 Cultura de células endoteliais na presença macrófagos tratados com CTX ou de sobrenadantes obtidos dessas mesmas células

As células endoteliais foram incubadas, por 24 horas, na presença de sobrenadantes obtidos de monoculturas de macrófagos previamente tratados com CTX (0,3µg/mL). Os dados obtidos demonstraram que a capacidade proliferativa das células endoteliais foi significativamente diminuída (34%), quando comparada ao grupo controle, composto por células endoteliais incubadas com sobrenadantes de macrófagos incubados apenas com meio de cultura (**Figura 5A)**. Simultaneamente, as co-culturas de macrófago/t.End.1 (cel:cel) foram mantidas para comparar a magnitude da resposta entre as diferentes culturas. Conforme observado ainda na **Figura 5A**, as células T.End.1 apresentaram a sua atividade proliferativa inibida (32%) quando co-cultivadas na presença de macrófago tratados com CTX, quando comparada às t.End.1 co-cultivadas com macrófagos controles. Ainda, esta inibição foi de magnitude similar ao observado na cultura de sobrenadante obtido de macrófagos tratados com CTX/t.End.1(**Figura 5A**).

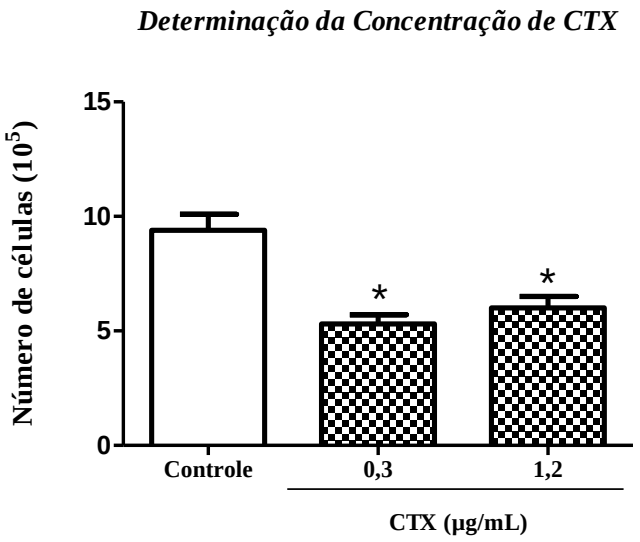
As **Figuras 5B e 5C** são representativas da migração da célula t.End.1, avaliada em ensaio de *Time Lapse*, por 180 min, período que possibilitou o acompanhamento da divisão celular, até o espraiamento e nova migração das células divididas. A **Figura 5B** representa a migração da célula endotelial na presença de sobrenadantes obtidos de macrófagos controle,

ou seja, pré-tratados apenas em meio de cultura. Neste período observou-se que a célula endotelial apresentou-se devidamente espraiada sobre o *coating* de colágeno tipo I, no T0. Após 40 min de análise, o citoesqueleto da célula tornou-se retraído para a mitose, observada após 80 min do início da análise. Após 100 min até 140 min, foi observado novo espraiamento das células sobre o *coating* de colágeno e a separação das células para a continuidade da migração, observada após 180 min de ensaio.

Diferentemente da Figura 5A, a célula endotelial da **Figura 5B**, incubada no mesmo período, na presença do sobrenadante obtido da monocultura de macrófagos tratados com a CTX, apresentou nos períodos de 140 min a 180 min, dificuldade da divisão do citoesqueleto após a divisão celular, evidenciando alteração da dinâmica do citoesqueleto, o que leva ao comprometimento da proliferação e migração da célula endotelial.

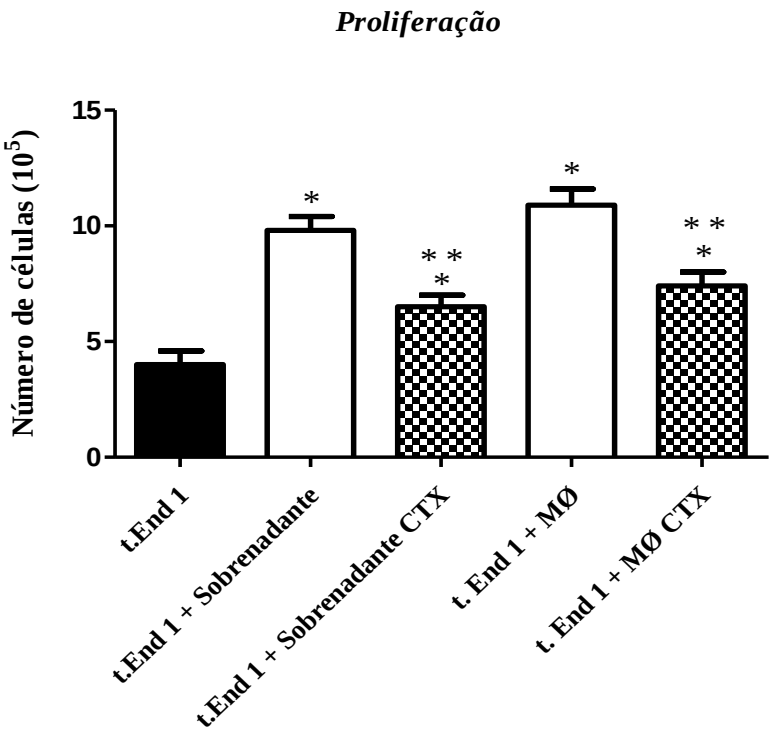
As **figuras 5B** e **5C** são representativas da capacidade proliferativa das células t.End.1 incubadas com sobrenadantes de macrófagos. Nessas figuras, estão evidenciadas as etapas da divisão celular, até o momento da separação da célula recém-formada a partir da sua célula existente. A **figura 5C** demonstra que, células endoteliais incubadas na presença de sobrenadantes obtidos de macrófagos tratados com CTX permanecem em contato célula a célula a partir de 140 até 180 minutos quando comparado ao grupo controle (**Figura 5B**).

Figura 4. Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com diferentes concentrações de CTX sobre a proliferação de células endoteliais

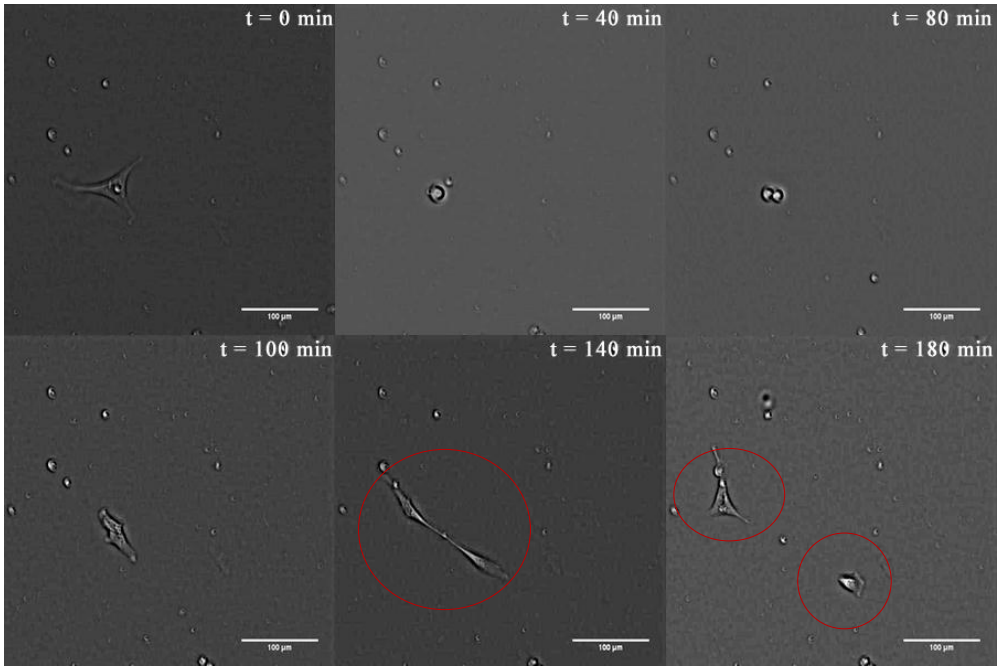


Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, aderidos ($1x10^6$/poço), em placas de 6 poços e incubados com CTX (0,3µg/mL ou 1,2µg/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram lavados e incubados em meio de cultura fresco contendo as células endoteliais ($5x10^5$ células/poço) e incubadas por 24 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, as células foram tripsinizadas, ressuspensas com PBS com adição de corante azul de Tripan 1% e o número apenas das células endoteliais foi determinado em câmara de Neubauer. *P<0,05, por comparação ao o grupo incubado com macrófagos pré-tratados apenas com meio de cultura (controle).

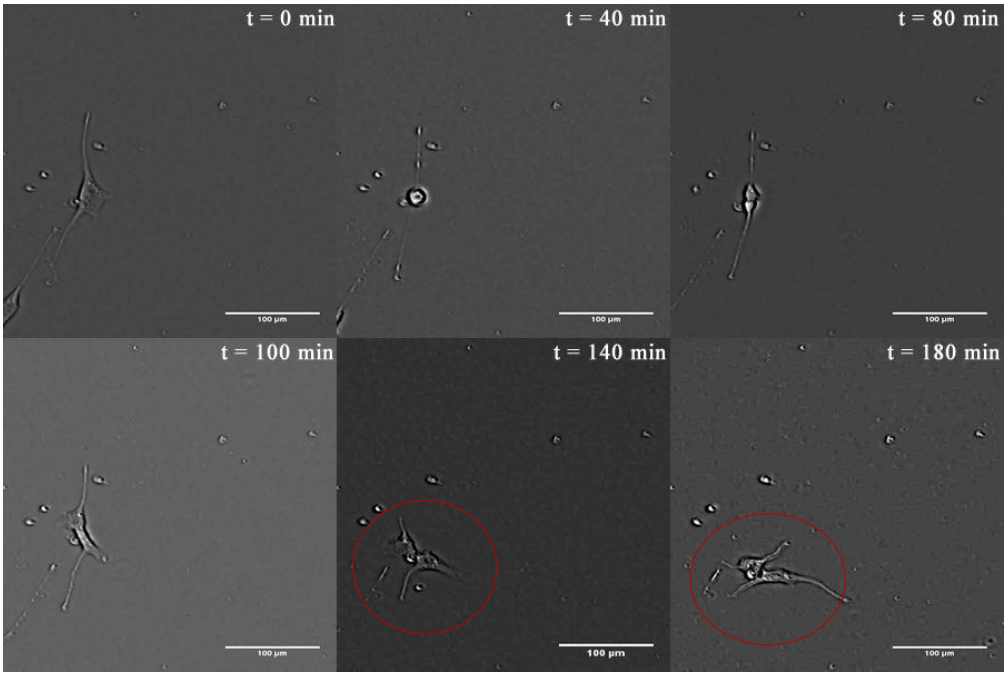
Figura 5. Efeito da atividade secretora de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a proliferação de células endoteliais



B



C



Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, aderidos ($1x10^6$/poço), em placas de 6 poços e incubados com CTX (0,3µg/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram lavados e incubados em meio RPMI 1640 fresco, por 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Em **A**, após este período foram realizados dois protocolos: 1) os sobrenadantes foram coletados e adicionados às culturas de células endoteliais ou 2) as células t.End.1 foram adicionadas às monoculturas de macrófagos (contato cel:cel). Após 24 horas, as células foram lavadas, tripsinizadas, ressuspensas com PBS com adição de corante azul de Tripan a 1% e o número de células endoteliais foi determinado em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos como Número de Células e representam a média ± e.p.m. para 6 amostras por grupo e representam 3 ensaios distintos. *P<0,05 por comparação ao o grupo incubado com t.End. 1 (controle); **P<0,05 por comparação dos grupos aos seus respectivos controles. As imagens representadas nos Painéis **B** e **C** foram obtidas em objetiva de 5x, após 180 min de migração na presença dos sobrenadantes dos macrófagos controles (**B**) ou tratados com CTX (**C**), avaliadas em ensaio de ***Time Lapse***.

5.2 *A adesão de células endoteliais (t.End.1), sobre diferentes componentes da matriz extracelular, após cultura em sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos pré-tratados com CTX*

Para investigar a ação dos sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com a CTX em relação à adesão da célula endotelial, foram utilizados diferentes componentes da matriz: o colágeno tipo I (10µg/mL), fibronectina (3µg/mL) e laminina (10µg/mL).

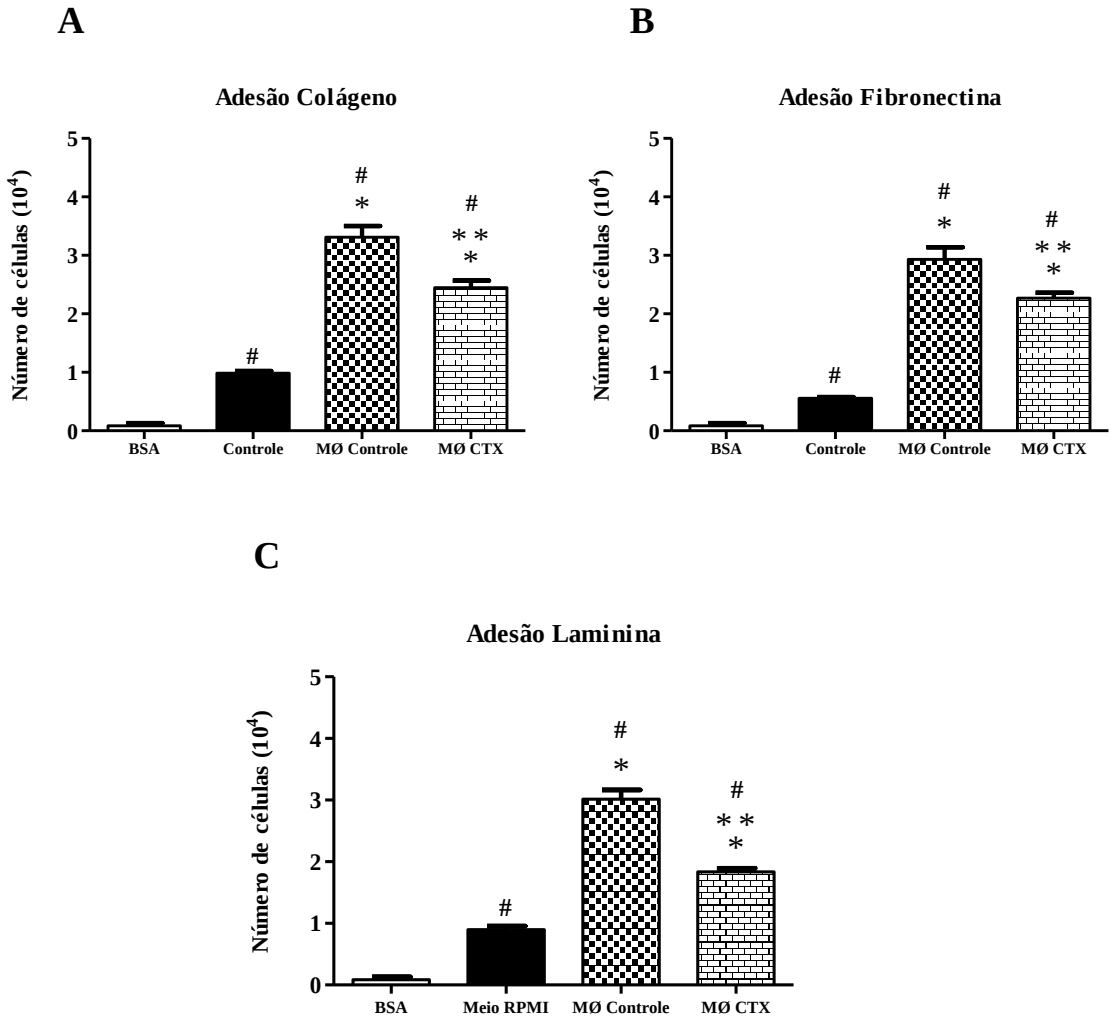
Como demonstrado nas **Figuras 6A, 6B e 6C**, os sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos controles induziram marcante aumento da adesão das células endoteliais sobre o colágeno tipo I (3,35x), fibronectina (5,28x) e laminina (3,68x), quando comparados às células t.End.1 incubadas em meio de cultura RPMI.

Entretanto, conforme observado na **Figura 6A**, o sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-tratados com CTX, inibiu significativamente (26%) a adesão das t.End.1 ao colágeno tipo I, quando comparada ao respectivo grupo controle, constituído de t.End.1 incubada com sobrenadante de macrófagos tratados previamente apenas com meio de cultura.

O mesmo foi observado em relação à fibronectina, uma vez que o sobrenadante de macrófagos pré-incubados com a CTX acarretou inibição significativa das células endoteliais (23%), em relação ao sobrenadante de macrófago controle (**Figura 6B**).

A incubação previa das células endoteliais em sobrenadantes obtidos das monoculturas de macrófagos tratados previamente com CTX, inibiu significativamente (39%) a adesão das t.End.1 a este componente, quando comparado ao seu grupo controle tratado previamente apenas com meio de cultura (**Figura 6C**).

Figura 6. Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com CTX sobre a adesão de células endoteliais (t.End.1) em diferentes ligantes da matriz extracelular



As células t.End.1 foram incubadas no dia anterior ao experimento, a 5% de CO_2 a 37 °C, na ausência (apenas RPMI 1640) ou na presença de sobrenadantes de macrófagos, tratados ou não com a CTX. A seguir, a suspensão de células ($1x10^5$ /100µL/poço) foi adicionada às placas Maxsorp (Nunc®), contendo 96 poços, previamente sensibilizados com os diferentes componentes de matriz colágeno tipo I - 10µg/poço; fibronectina - 3µg/poço e laminina - 10µg/poço. Após 1 h, as células que não aderiram foram removidas dos poços através de duas lavagens consecutivas com PBS. As células aderidas foram incubadas com 30 µL de MTT (5 mg/mL de PBS), por 3 horas e 100 µl de SDS 10%, dissolvido em PBS (contendo 0,01M de HCl) foram adicionados. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C por 18 horas. Após esse período, foi realizada a leitura espectofotométrica a 595 nm, em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). Os experimentos foram realizados em octuplicata. Os valores obtidos foram inseridos no programa GraphPad InSTAT; Software V2.01 para a conversão de densidade optica (DO) em número de células aderidas. Em **A**, **B** e **C**: *P<0,001, por comparação ao grupo controle (só meio de cultura). **P<0,001, por comparação ao grupo sobrenadante de macrófago controle. $^{\#}$P<0,001, por comparação ao grupo BSA.

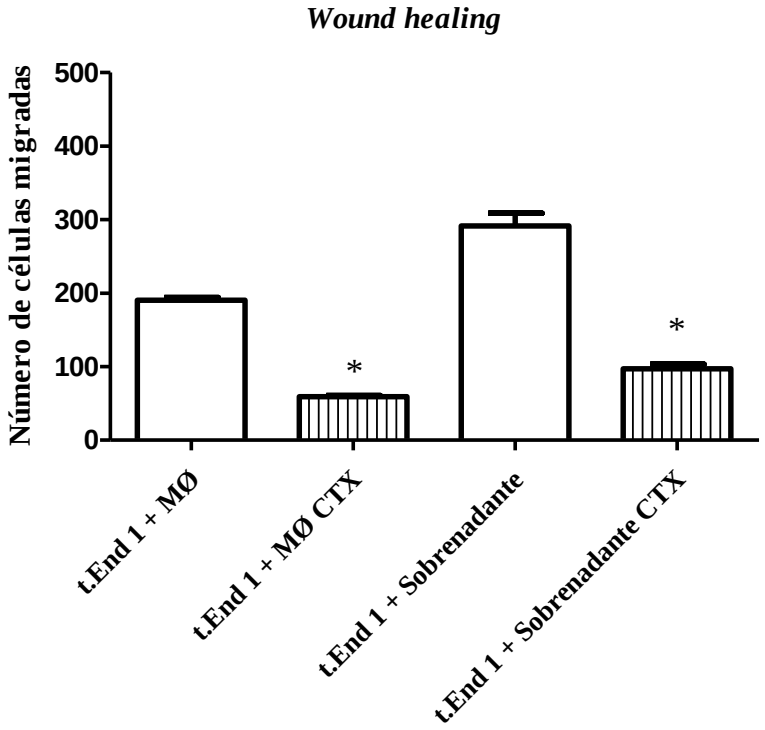
5.3 *A migração de células endoteliais (t.End.1) induzida por macrófagos tratados com CTX ou por seus sobrenadantes*

Os resultados apresentados na **Figura 7** demonstram que as células endoteliais incubadas na presença de macrófagos previamente tratados com CTX na concentração de 0,3µg/mL apresentaram significativa diminuição (49%) da migração, quando comparada à migração de células endoteliais cultivadas na presença de macrófagos incubados apenas com meio de cultura (controle).

Da mesma forma, as células endoteliais incubadas na presença de sobrenadantes de cultura de macrófagos tratados com CTX, na concentração de 0,3µg/mL, apresentaram inibição diminuição significativa (48%) da sua capacidade migratória, quando comparada à migração de células endoteliais cultivadas na presença de sobrenadantes de cultura de macrófagos tratados apenas com meio de cultura (controle).

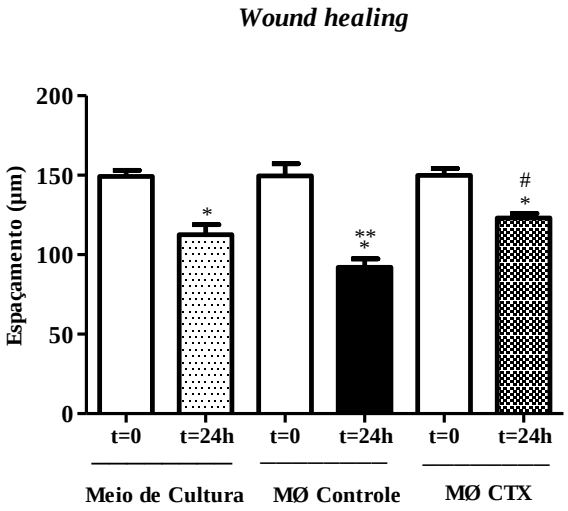
Na **Figura 8A**, os dados demostram que, após 24 horas de cultura, os campos apresentaram diminuição significativa do espaçamento entre as margens do campo, quando comparado aos respectivos T0, sendo esta diferença de 25%, para os campos das células endoteliais incubadas com meio de cultura; 38%, para os campos das células endoteliais incubadas na presença de sobrenadante de macrófagos controles, e de 18% para os campos das células endoteliais incubadas com os sobrenadantes obtidos de macrófagos tratados com a CTX (**Figura 8A**). Em relação ao tempo final (T 24h), os campos correspondentes às culturas de células endoteliais incubadas na presença de sobrenadantes obtidos de macrófagos tratados com meio de cultura apresentaram o espaçamento das margens diminuído em 18%, quando comparado ao espaçamento das culturas de células endoteliais incubadas apenas no meio de cultura (**Figura 8A**). Por outro lado, os campos relativos às culturas de células t.End.1, incubadas por 24 h na presença de sobrenadante de macrófagos tratados com a CTX, apresentaram maior espaçamento (34%), quando comparado ao grupo t.End.1/sobrenadante de macrófagos controles, evidenciando a inibição da migração das células endoteliais ao campo vazio (**Figura 8A**). A **Figura B** é representativa de cada cultura analisada: t.End.1 em Meio de cultura, sobrenadante de macrófagos controles ou sobrenadantes de macrófagos tratados, evidenciando os espaçamentos em T0 (tempo inicial) e T 24h (tempo final de análise).

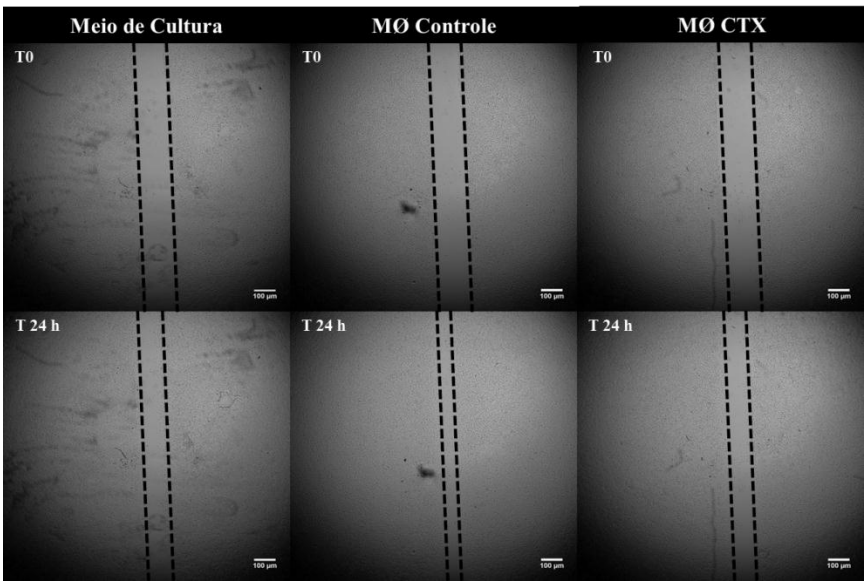
Figura 7. Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com a CTX e do sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a migração de células endoteliais, avaliada sobre o número de células migradas



As células endoteliais da linhagem t.End.1 ($1x10^6$ células/poço/mL) ou as células t.End.1 e macrófagos previamente tratados ou não com a CTX ($5x10^5$, de cada tipo celular) foram aderidos em placas de 24 poços, contendo lamínulas previamente revestidas com colágeno tipo I, por 1h, para a obtenção de uma monocamada confluente de células. Após este período, foi realizada uma interrupção, com uma ponteira de 200µl, as placas foram lavadas com PBS e os poços contendo apenas t.End.1 foram incubados na presença dos sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos tratados ou não com a CTX. Os poços contendo os dois tipos celulares foram incubados com meio de cultura RPMI. O ensaio foi realizado por 24 horas. Os resultados estão expressos como Número de Células Migradas no campo produzido pela interrupção com a ponteira de 200µL e representam a média ± e.p.m. para 6 amostras por grupo. *P<0,05, por comparação aos grupos incubados com macrófagos ou sobrenadantes de macrófagos pré-tratados apenas com meio de cultura (respectivos controles).

Figura 8. Efeito do sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a distância das margens do rompimento da monocamada de células endoteliais





Placas de 24 poços foram sensibilizadas com colágeno tipo I (10µg/mL), por 30 min a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, para a remoção de *debris* e $1x10^3$ células/poço foram semeadas e incubadas em meio RPMI por 24 horas. Após este período, as células foram incubadas na presença de sobrenadantes tratados ou não com CTX (0,3µg/mL). Em seguida, a placa foi acoplada ao equipamento In Cell Analyser GE 2200, locado no CEFAP, ICB/USP, em objetiva de 10x, por 24 h. O espaçamento foi calculado a partir do T0 (inicial de incubação até 24 h). Esses parâmetros foram avaliados por meio do software Image J. Os dados são a média de 5 amostras de cada grupo ± e.p.m. Na **Figura 8A** *P<0,05 por comparação com o T0, dos respectivos grupos; ** P<0,05 por comparação com grupo Meio de cultura e #P<0,05 por comparação com MØ Controle. **Figura 8B**, representativa das imagens tempo-resposta, obtidas em tempo real, a partir de T0 (início da cultura) e após 24 h.

5.4 *Efeito dos sobrenadantes obtidos de monocultura de macrófagos pré-tratados com CTX sobre o comportamento migratório de células endoteliais (t.End.1) em colágeno I, avaliado em Time-Lapse*

Uma vez que as células t.End.1 co-cultivadas na presença de macrófagos previamente tratados com a CTX ou incubadas nos sobrenadantes provenientes desses macrófagos apresentam sua capacidade de proliferação e migração, avaliada no modelo de *Wound healing*, inibidas de maneira similar, a partir do presente ensaio, apenas sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos, tratados ou não com a toxina, foram utilizados.

Em continuidade aos objetivos propostos, foi investigada a ação dos sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com CTX (0,3µg/mL) sobre o comportamento dinâmico das células t.End.1, dentre eles (1) Velocidade; (2) Distância Relativa (distância percorrida do ponto inicial ao ponto final, sem considerar o percurso total) e (3) Direcionalidade (isto é, a relação entre a distância relativa pela distância total).

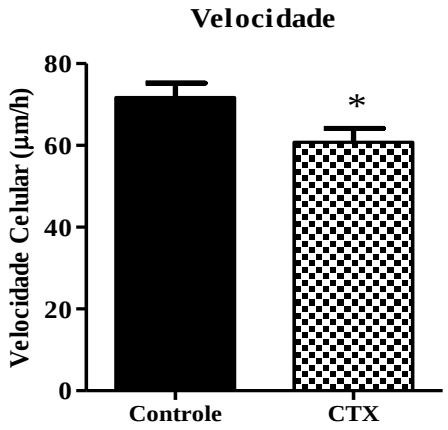
Este ensaio propiciou a obtenção das imagens tempo-resposta, obtidas em tempo real (desde T0, relativo ao início da análise, até T 18, relativo a 18 horas de incubação). Ao longo deste período, foi possível acompanhar o comportamento migratório e proliferativo célula a célula (por volta de cinco células por campo, 3 diferentes campos por poço, pelo menos 5 poços por tratamento, obtidas simultaneamente.

Apesar da inibição significativa da velocidade (15%) (**Figura 9A**), não foram observadas alterações sobre a distância relativa (**Figura 9B**) e sobre a direcionalidade (**Figura 9C**), durante a incubação com os sobrenadantes obtidos das monoculturas de macrófagos previamente tratados com a CTX, quando comparado aos seus respectivos grupos controles. Vale ressaltar que, para a análise de velocidade, distância relativa e direcionalidade, foram considerados os valores obtidos durante o período de 18 horas de incubação.

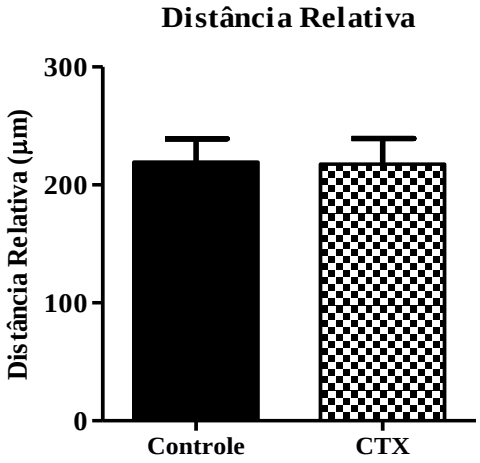
As **figuras 9D** e **9E** são representativas da imagem da migração em *Time-Lapse Long Time*.

Figura 9. Efeito dos sobrenadantes de macrófagos tratados com CTX sobre o comportamento migratório das células endoteliais (t.End.1) em colágeno I, avaliadas em *Time-Lapse*

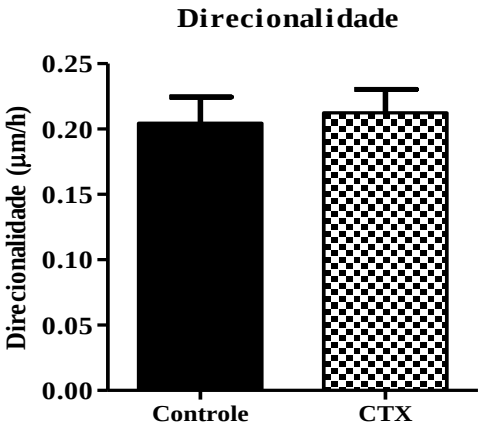
A



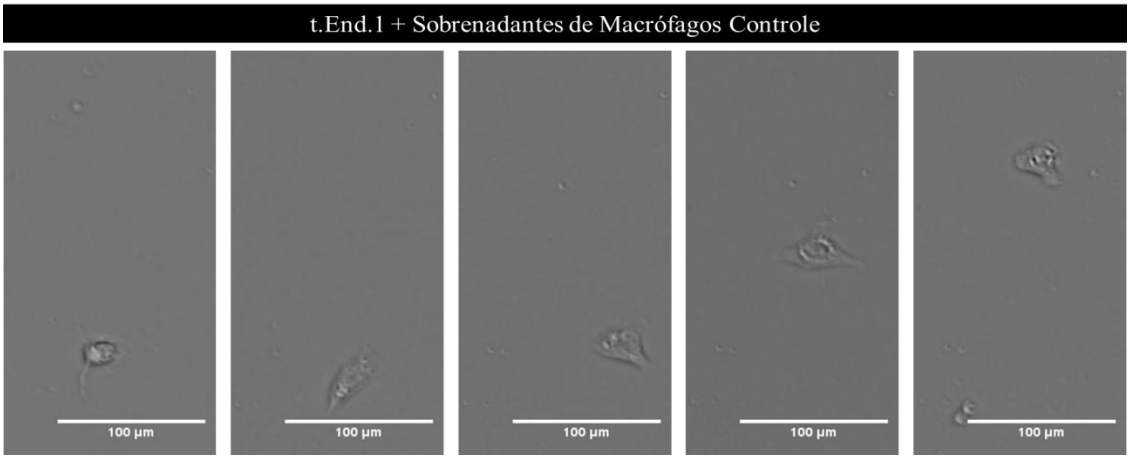
B



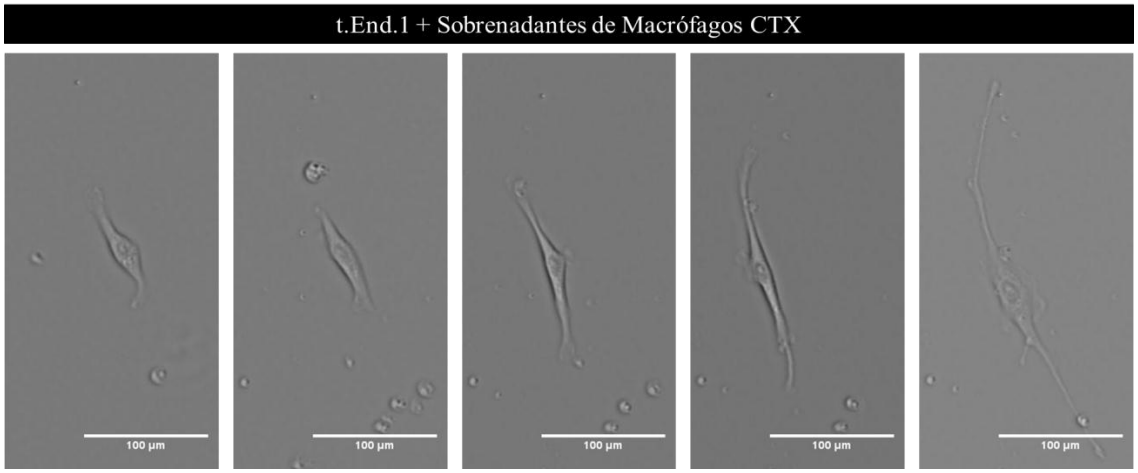
C



D



E



Placas de 24 poços foram sensibilizadas com colágeno tipo I (10µg/mL), por 30 min a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, para a remoção de *debris* e $1x10^3$ células/poço foram semeadas e incubadas em meio RPMI por 24 horas. Após este período, as células foram incubadas na presença de sobrenadantes tratados ou não com CTX (0,3µg/mL). Em seguida, a placa foi acoplada ao equipamento In Cell Analyser GE 2200, locado no CEFAP, ICB/USP, em objetiva de 10x, por 18 horas para avaliar a velocidade, distância relativa e direcionalidade das células t.End.1 em *coating* de colágeno I. Esses parâmetros foram avaliados por meio do software Image J. Os dados são a media ± e.p.m. e representam 2 ensaios distintos. Na **Figura 9A** *P<0,05 por comparação com o grupo controle (N=41 e CTX: N=36). **Figura 9D**, representativa das imagens tempo-resposta, obtidas em tempo real (0 a 18hs) que demonstram o comportamento migratório de t.End.1 em sobrenadante de macrófagos controle e **Figura 9E,** incubadas com sobrenadante de macrófagos tratados com CTX.

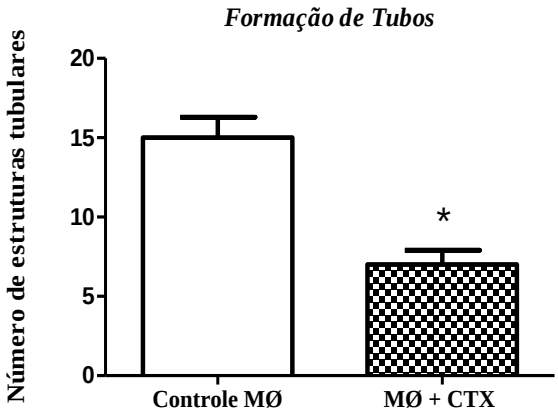
5.5 *Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com CTX sobre a formação de tubos em matrigel 3D*

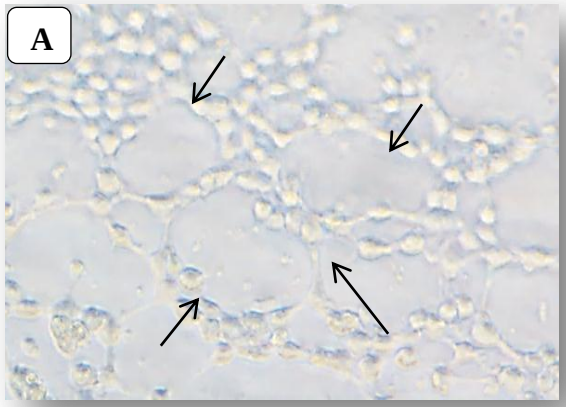
Neste ensaio, foi avaliada a ação de sobrenadantes coletados de monoculturas de macrófagos previamente tratados com a CTX sobre a capacidade das células endoteliais em invadir e formar estruturas tubulares do tipo capilares.

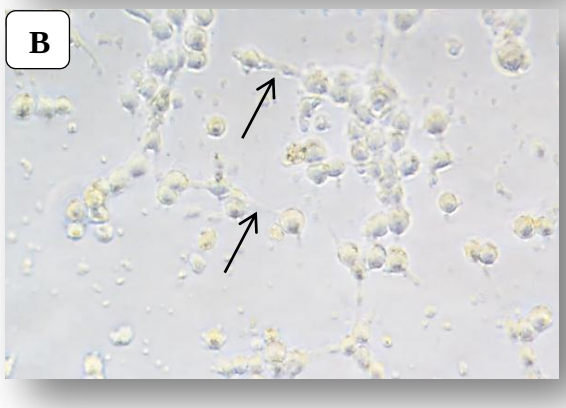
Como demonstrado na **Figura 10**, após 2 horas de incubação na presença de sobrenadante de macrófagos controle (previamente incubado na presença apenas de meio de cultura), as células endoteliais apresentaram ampla formação das estruturas tipo capilares, com estruturas alongadas e finas propiciando o contato célula-célula.

Por outro lado, células endoteliais incubadas na presença de sobrenadantes de monoculturas de macrófagos tratados previamente com CTX (0,3µg/mL) apresentaram significativa diminuição da capacidade de formação dessas estruturas do tipo capilar (53%), apresentando poucas estruturas comunicantes, quando comparado ao grupo controle, conforme apresentado na **Figura 10**.

Figura 10. Efeito de sobrenadantes de macrófagos pré-incubados com a CTX a formação de estruturas do tipo tubulares no matrigel 3D







Matrigel (9,3mg/mL) foi plaqueado (60µL) em cada poço da placa de 96 poços e polimerizados por 30 min a 37 ºC, 5% de CO_2. Após o período, células endoteliais t.End.1 ($2,5x10^4$células/50µL) foram adicionadas em 50µL de sobrenadante de macrófagos pré-tratados na ausência (controle) ou presença de CTX (0,3 µg/mL). Em seguida, o volume total de 100µL foi plaqueado sobre o Matrigel polimerizado e incubados por 2 horas, a 37 ºC 5% de CO_2. Os resultados estão expressos em número de estruturas tubulares e representam a contagem de 5 campos de 3 amostras distintas de cada grupo. *P<0,05, por comparação ao grupo controle incubado apenas com meio RPMI 1640. O **Painel A** representa a formação de tubos das células endoteliais incubadas com o sobrenadante de macrófagos incubados com meio de cultura (controle) e o **Painel B** representa a formação de tubos das células endoteliais incubadas com o sobrenadante de macrófagos pré-tratados com CTX. Imagens obtidas em objetiva de 40x.

5.6 *Efeito da CTX sobre a secreção de fatores angiogênicos por macrófagos*

Para avaliar a ação da CTX (0,3µg/mL) sobre a secreção dos principais fatores angiogênicos por macrófagos, após o pré-tratamento de 2 horas, seguida pela incubação de 24 horas, em meio de cultura fresco, a concentração de MMP-2, MMP-9, VEGF e TNF-α foi determinada.

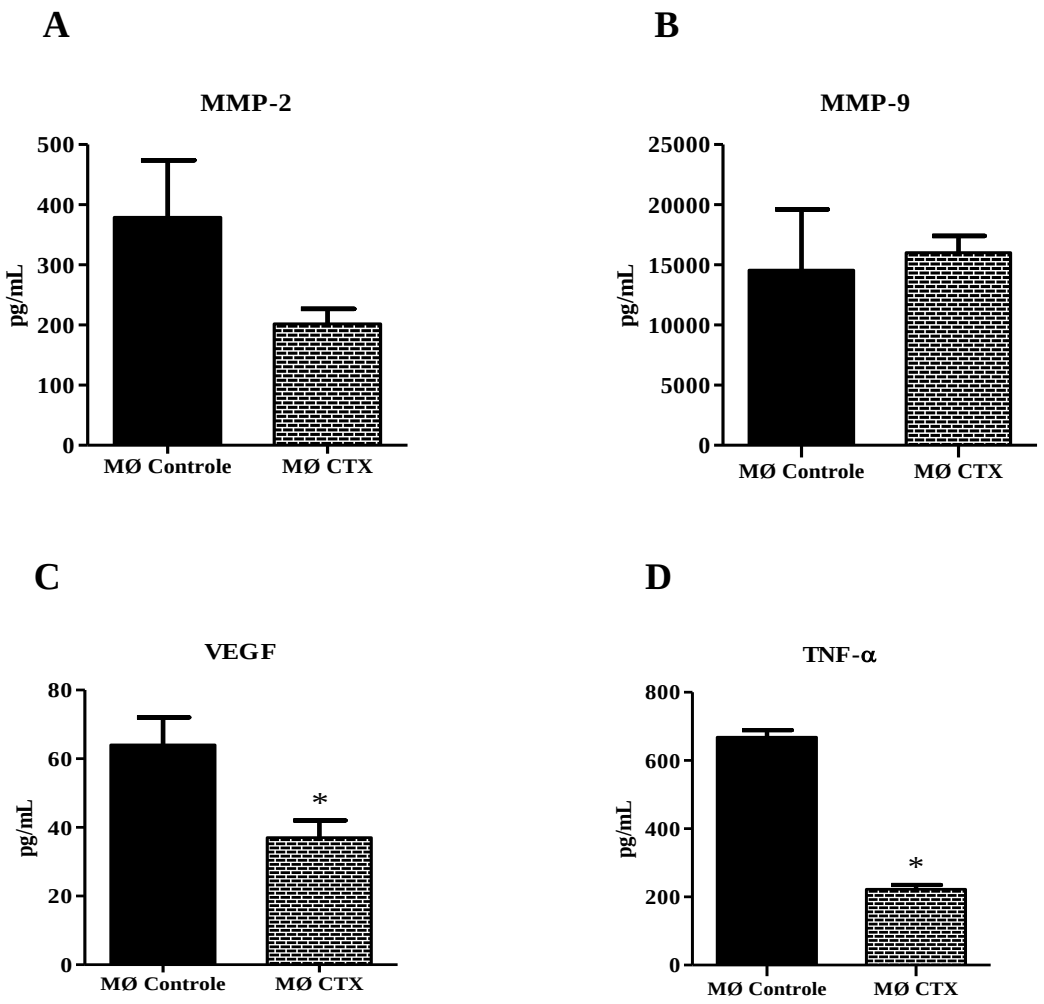
Na **Figura 11A**, observa-se que a CTX foi capaz de diminuir (47%) a secreção de MMP-2 de macrófagos, quando comparado ao seu respectivo grupo controle. Apesar desta diferença percentual, a diminuição não foi estatisticamente diferente.

Já, em relação à secreção de MMP-9, não foram observadas diferenças entre os macrófagos tratados na ausência ou na presença de CTX, conforme demonstra a **Figura 11B**.

Em relação à secreção de VEGF, a **Figura 11C** demonstra significativa atividade inibitória da CTX (42%) sobre a secreção deste mediador por macrófagos, quando comparado aos macrófagos incubados apenas na presença do meio de cultura.

Da mesma forma, pode-se observar na **Figura 11D**, uma notável inibição (67%) da secreção de TNF-α por macrófagos tratados com a toxina, quando comparado aos macrófagos controle, ou seja, incubados apenas com meio de cultura RPMI.

Figura 11. Efeito da CTX sobre a liberação de MMP-2, MMP-9, VEGF e TNF-α por macrófagos



Os macrófagos ($1x10^6$/mL) foram aderidos por 1 hora e incubadas na ausência ou presença de CTX (0,3µg /mL), por 2 horas, a 37 ºC e 5% de CO_2. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas por 24 h na presença de meio fresco. Após este período, os sobrenadantes foram coletados para a determinação da concentração de MMP-2, MMP-9, VEGF e TNF-α, por meio de ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando kit comercial. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (Multiscan), absorbância em 450 nm. Os dados são a média ± e.p.m. Em **C**: *P<0,01, por comparação com o respectivo grupo de controle. Em **D**: *P<0,0001, por comparação com o grupo controle. Os gráficos são representativos de 6 amostras de 2 experimentos independentes.

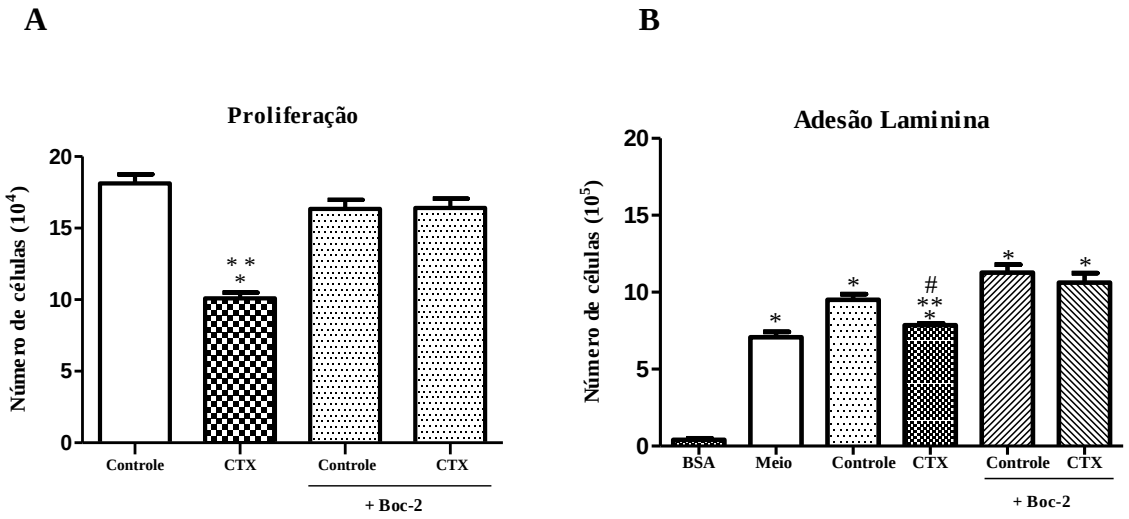
5.7 *Envolvimento do receptor para peptídeo formil (FPR), ligante da LXA4, na ação inibitória dos sobrenadantes de macrófagos tratados com a CTX sobre a função da célula endotelial*

Para avaliar a importância dos FPRs no mecanismo envolvido com as ações dos sobrenadantes obtidos de monocultura de macrófagos tratados com a CTX, estas células foram incubadas na presença do antagonista seletivo para FPRs, o Boc-2. Este receptor é o ligante da LXA_4, mediador lipídico secretado em quantidades aumentadas tanto por monocultura de macrófagos, como por macrófagos incubados na presença de células tumorais. Para essa avaliação, foram realizados os ensaios de proliferação e adesão celular.

Como demonstrado na **Figura 12A,** sobrenadantes obtidos de macrófagos incubados com CTX, na concentração de 0,3µg/mL acarretou significativa inibição (44%) da proliferação das células endoteliais, quando comparado ao seu respectivo grupo controle, incubado apenas com meio de cultura. Por outro lado, quando os macrófagos foram incubados primeiramente com o Boc-2 (100µM, por 15 min), observou-se o bloqueio total da ação inibitória da CTX, quando comparado ao grupo CTX+Boc-2. Ainda, a porcentagem de proliferação do grupo CTX+Boc-2 foi similar aos obtidos nos grupos Controle e Controle+Boc-2, conforme demonstra a **Figura 12A**.

A incubação previa das células endoteliais em sobrenadantes obtidos das monoculturas de macrófagos tratados previamente com CTX, inibiu significativamente (17%) a adesão das t.End.1 a este componente, quando comparado ao seu grupo controle tratado previamente apenas com meio de cultura (**Figura 12B**). A incubação prévia com o Boc-2 (100µM, por 15 min), aboliu a ação inibitória da CTX sobre a adesão, quando comparado ao grupo CTX+Boc-2.

Figura 12. Efeito do Boc-2 sobre ação inibitória de macrófagos tratados com a CTX na proliferação e adesão das células endoteliais



Macrófagos ($1x10^6$) foram incubados e aderidos em garrafas de cultura de $75cm^3$ e incubados com 100 µM/mL de Boc-2, antagonista seletivo de FPR, por 15 minutos a 37°C. Após este período, os macrófagos foram lavados com PBS e incubados com CTX (0,3µg/mL), por 2h. Após este período, foram incubados em meio fresco por 24 h. Em **Fig. 12A**, células endoteliais t.End.1 ($1x10^5$ células/poço) foram aderidas em placas de 6 poços, por 2 horas. Após esse período, os poços foram lavados e os sobrenadantes dos macrófagos foram adicionados às células t.End.1. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram retirados e as células endoteliais foram tripsinizadas, ressuspensas com PBS e com corante azul de tripan 1% e o número de células determinado em câmara de Neubauer, em microscopia de luz. Em A Os dados são a media ± e.p.m. *P<0,05 por comparação com o grupo controle (N=6 e CTX: N=6). **P<0,05 por comparação com os grupos controle+Boc-2 e CTX+Boc-2 (N=6 cada). Em **Fig. 12B**, a suspensão de células ($1x10^5$ /100µL/poço) foi adicionada às placas Maxsorp (Nunc®), contendo 96 poços, previamente sensibilizados com laminina - 10µg/poço. Após 1 h, as células que não aderiram foram removidas e incubadas com 30 µL de MTT (5 mg/mL de PBS), por 3 horas e 100 µl de SDS 10%, por 18 horas. Após esse período, foi realizada a leitura espectofotométrica a 595 nm, em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). Os experimentos foram realizados em octuplicata. *P<0,001, por comparação ao grupo BSA.**P<0,001, por comparação ao grupo controle. #P<0,001, por comparação aos grupos controle+Boc-2 e CTX+Boc-2. Os valores obtidos foram inseridos no programa GraphPad InSTAT; Software V2.01 para a conversão de densidade optica (DO) em número de células aderidas. Estes gráficos são representativos de 2 ensaios experimentais distintos para cada modelo.

6 DISCUSSÃO

Como citado na Introdução, a formação do microambiente tumoral requer a interação entre as células tumorais e as células estromais, tais como as endoteliais e as inflamatórias, particularmente os macrófagos, potentes efetores do crescimento tumoral, angiogênese e linfangiogênese (LINDE et al., 2012). Os macrófagos são recrutados para todos os tumores sólidos e contribuem de forma crucial para a progressão do tumor por secretarem proteases, substâncias angiogênicas e fatores de crescimento (MANTOVANI et al., 1992; POLLARD, 2009).

Portanto, em continuidade aos estudos que caracterizam os mecanismos envolvidos na ação antitumoral da CTX, o objetivo do presente projeto foi investigar se a atividade secretória de macrófagos tratados com CTX interfere nos eventos-chave da neovascularização, tais como a adesão, migração e proliferação de células endoteliais.

Inicialmente as monoculturas de macrófagos foram estabelecidas para investigar a influência dessas células, tratadas previamente com diferentes concentrações da CTX, sobre a proliferação das células endoteliais. As células endoteliais, quando em contato direto (co-cultura cel:cel) com macrófagos tratados com CTX (0,3µg/mL e 1,2µg/mL) por 2 horas, apresentaram importante redução da proliferação (44% e 36%, respectivamente). De fato, macrófagos pré-tratados com a CTX (0,3µg/mL) por 2 horas, aumentam a capacidade secretória de reativos de oxigênio, nitrogênio e de lipoxinas, e também inibem a proliferação de células tumorais, observada por até 48 horas, no modelo de co-cultura (COSTA et al., 2013).

Da mesma forma, a escolha das concentrações avaliadas foi baseada em estudos que demonstram que a concentração de 0,3µg/mL modula a funcionalidade de macrófagos, inibindo ou estimulando suas atividades secretórias (SAMPAIO, et al., 2006a; SAMPAIO, et al., 2006b; COSTA et al., 2013). Ainda, a concentração de 1,2µg/mL de CTX acarreta inibição direta (KATO et al., 2013) e mais pronunciada de diferentes funções das células endoteliais da linhagem t.End.1, envolvidas com a neovascularização. Baseado nestes fatos, investigamos se a concentração de 1,2µg/mL ampliaria as ações da CTX sobre as atividades secretórias dos macrófagos. Os resultados obtidos demonstram que as concentrações testadas acarretam ações inibitórias de magnitude similar, sugerindo que a concentração de 0,3µg/mL já é a mínima necessária para induzir as alterações funcionais e secretórias. É importante ressaltar, que em nenhuma das concentrações utilizadas, a inibição observada não foi

decorrente da perda de viabilidade, avaliada pelo corante azul de Tripan e pelo cristal violeta (*dados não mostrados*).

Estudos da literatura demonstraram que macrófagos peritoneais *in vitro* secretam mediadores com potencial modulatório sobre a proliferação das células endoteliais, tais como citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases e mediadores lipídicos que (COSTA et al., 2013; HERRERA et al., 2014).

Baseado neste fato, com intuito de verificar se o sobrenadante de macrófagos obtido de monoculturas de macrófagos previamente tratados com as diferentes concentrações da CTX poderia apresentar o mesmo efeito inibitório observado sobre a proliferação das células endoteliais no contato célula-célula.

Os resultados mostraram que a incubação das células endoteliais com esses sobrenadantes acarretou inibição da proliferação das t.End.1, de mesma magnitude, em todas as concentrações das CTX utilizadas na cultura dos macrófagos e de maneira similar ao ensaio de co-cultura cel:cel. Por tanto, a partir deste ensaio, apenas a concentração de 0,3µg/mL foi utilizada.

Da mesma forma que observado nesses ensaios, as análises em *Time Lapse* evidenciaram um retardo dos eventos da proliferação, quando as células endoteliais foram incubadas com o sobrenadante dos macrófagos pré-tratados com CTX.

No início da proliferação foi observada uma similaridade entre o efeito dos macrófagos tratados ou não com a CTX. Entretanto, após a divisão celular e a separação do citoesqueleto para a formação de duas células, o sobrenadante dos macrófagos tratados com CTX dificultou esta dinâmica do citoesqueleto, levando as células se dissociarem muito tempo depois. Este resultado indica que a secreção dos macrófagos tratados com a CTX altera a dinâmica do citoesqueleto durante a divisão celular, o que pode contribuir com a diminuição da proliferação da célula endotelial.

Como mencionado anteriormente, os eventos de adesão e migração são fundamentais para vários processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento vascular e angiogênese. Nestes processos, a migração de células endoteliais, a partir de vasos preexistentes, bem como a proliferação dessas células, é essencial para a angiogênese associada à remodelagem e à nutrição do crescimento tumoral, respectivamente (DAVIS et al., 2005; ELICEIRI; CHERESH, 2001). O processo de neovascularização é dependente de um delicado balanço entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos secretados tanto por células tumorais, células endoteliais, bem como outras células estromais, tais como macrófagos (GOMES et al., 2013).

A proliferação e a migração de células endoteliais são dependentes do grau de adesão entre a célula e o seu ligante da matriz extracelular.

Assim, em continuidade aos objetivos propostos foi realizado o ensaio de adesão, utilizando diferentes componentes de matriz. Para tanto, foram realizados *coating* bidimensional (2D) de colágeno tipo I, laminina e fibronectina, ou seja, diversos ligantes de distintas integrinas.

Os dados obtidos demonstram que sobrenadantes de macrófagos intensificaram a adesão das células endoteliais, independentemente do componente de matriz avaliado. Esses resultados estão de acordo com a literatura (WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2012;). Por outro lado, os sobrenadantes de cultura de macrófagos tratados com a CTX, inibem a adesão da célula endotelial, a todos os substratos, sendo que essa inibição foi mais pronunciada frente à laminina. Durante a angiogênese, componentes da membrana basal, tais como colágeno tipo IV e laminina, a principal proteína adesiva da membrana basal, estabilizam os novos vasos formados. A laminina é um componente biologicamente bem ativo e está relacionada com fenótipo de malignidade, sendo um componente que promove a adesão, migração, proliferação, crescimento tumoral, angiogênese e metástases (ENGBRING; KLEINMAN, 2003).

Uma vez que a migração celular é o componente essencial para a progressão tumoral, foram realizados ensaios de migração *in vitro* utilizando o modelo do *wound healing*. Novamente, observamos que tanto o co-cultivo entre macrófagos tratados com CTX, quanto o sobrenadante dessas monoculturas inibiram a capacidade migratória das células endoteliais, após 24 horas de incubação. Complementando os dados obtidos em modelo de *Wound Healing*, foi realizado o modelo de *Time Lapse* para avaliar os diferentes parâmetros da migração de uma célula endotelial incubada com sobrenadantes dos macrófagos pré-tratados com CTX. Nas análises por *Time Lapse*, em ensaio de migração (*Long time*) em 2D foi observada diminuição da velocidade de migração da célula endoteliais incubada na presença do sobrenadantes de macrófagos previamente tratados com a CTX. Ainda, é importante ressaltar que, para o ensaio de *time lapse*, as células foram submetidas à migração prévia (por 24 horas) antes da pré-incubação com os sobrenadantes, pois o objetivo foi avaliar o comportamento do citoesqueleto durante a migração e não durante a invasão. Mesmo no tratamento pós-migração, as imagens evidenciam que as t.End.1 apresentaram alteração da morfologia e comportamento migratório, durante as 18 horas de análise. Vale ressaltar que neste ensaio foi possível acompanhar o comportamento célula a célula, incubadas com sobrenadante controle ou de macrófagos tratados com CTX.

A diminuição da velocidade de migração observada é sugestiva de que as células endoteliais apresentaram dificuldade de estabelecer projeções do citoesqueleto para a migração. Apesar da distância relativa e da direcionalidade não terem sido modificadas, uma das características morfológicas que indicam esse comportamento celular alterado pelo sobrenadante é o prolongamento do citoesqueleto, tanto na parte dianteira, quanto traseira. Essa morfologia é compatível ao observado em células endoteliais com inibição da ativação de RhoA e fosforilação de miosina (MOORE et al., 2005).

Considerando a importância dos eventos de proliferação, adesão e migração para a formação dos vasos, no presente estudo investigamos se o efeito inibitório da CTX sobre esses eventos comprometeria a formação de vasos. Nesse sentido, foi utilizado o Matrigel, uma membrana basal reconstituída, que pode propiciar condições similares ao observado em microambiente tumoral, uma vez que é proveniente do sarcoma de murinos EHS, fornecendo assim, rápida formação de estruturas tubulares em um sistema 3D, sendo um método simples e facilmente quantificável (ARNAOUTOVA et al., 2009; BAZAA et al., 2010). As células endoteliais na presença apenas do meio de cultura apresentam rede estabilizada, com formação de estruturas alongadas e com intensa comunicação célula-célula a partir da 6ª hora, corroborando aos dados de Kato e colaboradores (2013), que observaram a formação de vasos neste período.

No presente estudo, investigamos apenas a ação de sobrenadantes obtidos de monoculturas de macrófagos tratados ou não com a toxina. Foi observado que a adição de sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos intensifica a formação da rede de capilares, sendo observadas já após 2 horas de incubação. Esse efeito estimulatório foi observado em outros estudos, que demonstraram que sobrenadante de macrófagos intensifica a formação de estruturas tubulares, mediada por fatores angiogênicos (WANG et al., 2013). Esta formação de estruturas do tipo capilar, etapa essencial do processo de angiogênese, também foi alterada na presença de sobrenadantes obtidos de macrófagos tratados com CTX, uma vez que foi observada a alteração da morfologia da célula endotelial o que impede a formação da rede de capilares no matrigel.

Além disso, os resultados deste ensaio corroboram com os dados obtidos nos ensaios de migração celular, que nos permite sugerir que a macrófagos tratados com esta toxina afetam os principais processos que dependem diretamente da reorganização do citoesqueleto.

É importante ressaltar que durante a angiogênese, a formação da adesão, bem como sua maturação e reorganização do citoesqueleto é um processo contínuo e balanceado entre a polimerização da actina e a contração da actomiosina (PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ,

2010), essencial para a migração celular. A aderência das células endoteliais à matriz extracelular durante a migração é um evento que ocorre dependente ou independentemente de quimioatrativos (LÄMMERMANN et al., 2008), iniciando uma cascata de sinalização angiogênica, via transdução de sinal pelas integrinas e pelos receptores de fatores de crescimento nas células endoteliais. Esta via de transdução está co-localizada com a região citoplasmática das integrinas e pode ativar direta e indiretamente moléculas sinalizadoras responsáveis por regular a proliferação e a migração celular (AVRAAMIDES; GARMY-SUSINI; VARNER, 2008). Esses eventos podem ser modulados pelos macrófagos, que dependendo do seu estado de ativação, secretam substâncias que inibem ou favorecem a neovascularização (LAMAGNA; AURRAND-LIONS; IMHOF, 2006).

Os nossos resultados demonstram que os sobrenadantes obtidos de monoculturas de macrófagos tratados com CTX inibem todas as funções das células endoteliais presentemente avaliadas, sugerindo que a CTX altera a liberação de mediadores secretados por macrófagos que afetam os eventos envolvidos com a angiogênese. Outras substâncias promotoras da neovascularização e das funções relacionadas à formação do estroma tumoral, também são secretadas pelos macrófagos, tais como VEGF, serino-proteases, tais como MMP (RIABOV et al., 2014). Nesse sentido com o intuito de caracterizar o efeito inibitório da ação da CTX sobre a secreção desses mediadores por macrófagos, foi determinada a liberação de VEGF, TNF-α e MMP-2, MMP-9.

Os resultados evidenciaram que a CTX inibiu a secreção de VEGF em sobrenadantes de macrófagos. É interessante ressaltar que as MMPs, especialmente de MMP-9, ativam e liberam VEGF que é obtido pela matriz extracelular, permitindo a migração das células endoteliais. Em adição às suas propriedades pró-angiogênicas, o VEGF é também um regulador de MMP-9, criando assim um *feedback* positivo entre a MMP-9 e VEGF (HOLLBORN et al., 2007). Apesar dessa associação entre esses dois mediadores não foram observadas alterações estatisticamente significantes em relação ao MMP-2 e MMP-9.

Estudos demonstraram que a expressão de genes específicos, para IL-6, IL-8, VEGF, MMPs, foi aumentada em co-cultura de células tumorais com macrófagos, em comparação à meios de cultura sem o co-cultivo e demonstram que este sobrenadante de macrófagos induz a proliferação e a migração das células tumorais (CHEN et al., 2005; JEDINAK; DUDHGAONKAR; SLIVA, 2010; ZHANG et al., 2012).

Como mencionado na Introdução, o TNF-α, em conjunto com o VEGF e o TGF-β é uma das principais citocinas secretadas pelos macrófagos associadas à angiogênese tumoral (KLIMP et al., 2002; LEE; LIU; HUANG, 2006).

Portanto, a concentração deste mediador inflamatório foi também determinada nos sobrenadantes de macrófagos. Em nossos dados, podemos observar que houve inibição significativa da secreção de TNF-α nos sobrenadantes previamente tratados com a toxina. Este dado está de acordo ao observado em monoculturas de macrófagos tratados com CTX, como demonstrado por Costa e colaboradores (2013).

Essas substâncias podem ainda ser reguladas por mediadores lipídicos, tais como a lipoxina A_4 (LXA_4) e seu análogo mais estável, a 15-epi-lipoxina A_4, (15-epi- LXA_4), descritos como potentes fatores antitumorais e antiangiogênicos (FIERRO; KUTOK; SERHAN, 2002). Nosso grupo demonstrou que a CTX estimula a secreção desses mediadores lipídicos por macrófagos, tanto em monocultura como em co-cultura com células tumorais. Ainda, neste estudo, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores para peptídeo formil (FPRs), ligantes desses mediadores, impede as ações da CTX sobre a atividade secretória dos macrófagos sobre as células tumorais, mostrando a participação desses receptores para esses efeitos da CTX (COSTA et al., 2013).

Baseado nestes fatos foi investigada a possível participação dos FPRs na atividade inibitória da CTX sobre os efeitos dos macrófagos nos eventos da neovascularização. De fato, nossos resultados demonstraram que o receptor FRP pode contribuir para este efeito, uma vez que o Boc antagonista seletivo dos FPRs bloqueou a atividade inibitória de macrófagos tratados com a CTX em ensaios de proliferação e adesão celular. Tanto a LXA_4 nativa quanto seu análogo natural 15-epi-LXA_4, mais potente e estável que mimetiza algumas das bioatividades das LXAs (PARKINSON, 2006), exercem seus efeitos biológicos específicos após a ligação a estes receptores transmembranicos, acoplados à proteína G, conhecidos também como ALXR, os quais foram identificados em vários tipos celulares (CHIANG; SERHAN, 2006; FIORE et al., 1994). Uma desses efeitos pode levar, por exemplo, à inibição de algumas interleucinas, tais como TNF-α, além da inibição de MMPs e da secreção de VEGF, bem como a expressão de receptor VEGF-2 (CEZAR-DE-MELLO et al., 2008; FIERRO; KUTOK; SERHAN, 2002; VIEIRA et al., 2014; WU et al., 2005), sugerindo que ação inibitória dos macrófagos sobre a secreção desses mediadores pode ser decorrente da liberação de LXA_4 e 15-Epi-LXA_4 pelos macrófagos, após o tratamento com a CTX, demonstrada em estudos anteriores (COSTA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2006a).

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo demonstram que macrófagos tratados com CTX ou sobrenadantes obtidos dessas células inibem funções de células endoteliais, tais como proliferação, adesão, migração, a secreção de mediadores pró-angiogênicos e, consequentemente, sua capacidade de formação de tubos. Portanto, nossos

dados demonstram, pela primeira vez, a importância da ação imunomodulatória da CTX sobre as células do estroma na angiogênese.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos no presente Projeto de pesquisa demonstraram que a CTX altera a atividade secretória de macrófagos, em particular, inibindo fatores pró-angiogênicos, levando à inibição dos eventos envolvidos na angiogênese, tais como proliferação, adesão e migração. Ainda, receptores para peptídeo formil participam de maneira importante das ações da CTX. Esta atividade antiangiogênica dos macrófagos pode ser crucial para a atividade antitumoral descrita para a CTX.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Ver. Immunol.,** v. 2, p. 283-318, 1984. ISSN 0732-0582.

AIRD, S. D. et al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 249, n. 2, p. 296-300, Sep 1986. ISSN 0003-9861.

AMARAL, C. F.; MAGALHÃES, R. A.; DE REZENDE, N. A. [Respiratory involvement secondary to crotalid ophidian bite (Crotalus durissus)]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo,** v. 33, n. 4, p. 251-215, 1991 Jul-Aug 1991. ISSN 0036-4665.

AMORIM, M. F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. **Envenenamento Botrópico e Crotálico**: Mem. Inst. Butantan. 23**:** 108 p. 1951.

ARNAOUTOVA, I. et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis,** v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009. ISSN 1573-7209.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer,** v. 8, n. 8, p. 604-617, Aug 2008. ISSN 1474-1768.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in Brazil. **Toxicon,** v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985. ISSN 0041-0101.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon,** v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987. ISSN 0041-0101.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med. (Fremantle),** v. 13, n. 1, p. 28-36, Mar 2001. ISSN 1035-6851.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One,** v. 5, n. 4, p. e10124, 2010. ISSN 1932-6203.

BHAUMIK, S. et al. Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. **Exp. Cell Res.,** v. 266, n. 1, p. 44-52, May 2001. ISSN 0014-4827.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J. Pathol.,** v. 196, n. 3, p. 254-265, Mar 2002. ISSN 0022-3417.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Semin. Immunopathol.,** v. 35, n. 5, p. 585-600, Sep 2013. ISSN 1863-2300.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell Metab.,** v. 15, n. 4, p. 432-437, Apr 2012. ISSN 1932-7420.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.,** v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989. ISSN 0326-6656.

BORASCHI, D. et al. Endothelial cells express the interleukin-1 receptor type I. **Blood,** v. 78, n. 5, p. 1262-1267, Sep 1991. ISSN 0006-4971.

BRAZIL, V. **Do emprego a peçonha em terapêutica**. São Paulo: Biologia Medica. I**:** 7-21 p. 1934.

_____. **Do emprego da peçonha em terapêutica**. São Paulo: Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia. 60**:** 398-408 p. 1950.

BRAZIL, V. O. Neurotoxins from the South American Rattle Snake Venom. **J. Formosan Med. Assoc.,** v. 71, p. 394-400, 1972.

BROWN, L. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. **EXS,** v. 79, p. 233-269, 1997. ISSN 1023-294X.

CALORINI, L. et al. Inhibition of lipoxygenase pathway in macrophages co-cultivated with tumor cells. **Cancer Lett.,** v. 223, n. 1, p. 151-158, Jun 2005. ISSN 0304-3835.

CAPDEVILA, J. et al. Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P-450. **Biochem. Biophys. Res. Commun,** v. 141, n. 3, p. 1007-1011, Dec 1986. ISSN 0006-291X.

CEZAR-DE-MELLO, P. F. et al. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Br. J. Pharmacol.,** v. 153, n. 5, p. 956-965, Mar 2008. ISSN 0007-1188.

CHEN, J. J. et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. **J. Clin. Oncol.,** v. 23, n. 5, p. 953-964, Feb 2005. ISSN 0732-183X.

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. New mechanism for an old drug: aspirin triggers anti-inflammatory lipid mediators with gender implications. **Compr. Ther.,** v. 32, n. 3, p. 150-157, 2006. ISSN 0098-8243.

CHIRIELEISON, S. M. et al. Automated live cell imaging systems reveal dynamic cell behavior. **Biotechnol. Prog.,** v. 27, n. 4, p. 913-924, Jul 2011. ISSN 1520-6033.

CHO, H. J. et al. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model. **Breast Cancer Res.,** v. 14, n. 3, p. R81, 2012. ISSN 1465-542X.

CHOUMET, V. et al. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v. 391, p. 197-202, 1996. ISSN 0065-2598.

CLÀRIA, J. Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. **Recent. Pat. Anticancer Drug Discov.,** v. 1, n. 3, p. 369-382, Nov 2006. ISSN 1574-8928.

COHN, Z. A. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **J. Immunol,** v. 121, n. 3, p. 813-816, Sep 1978. ISSN 0022-1767.

COSTA, E. S. et al. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon,** v. 74, p. 167-178, Nov 2013. ISSN 1879-3150.

CUENOD, C. A. et al. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. **Abdom. Imaging,** v. 31, n. 2, p. 188-193, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0942-8925.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 82, n. 6, p. 924-929, 1988. ISSN 0035-9203.

CURY, Y.; PICOLO, G. Animal toxins as analgesics--an overview. **Drug News Perspect.,** v. 19, n. 7, p. 381-392, Sep 2006. ISSN 0214-0934.

DANSON, C. M. et al. Phosphorylation of WAVE2 by MAP kinases regulates persistent cell migration and polarity. **J. Cell Sci.,** v. 120, n. Pt 23, p. 4144-4154, Dec 2007. ISSN 0021-9533.

DASS, C. R.; TRAN, T. M.; CHOONG, P. F. Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. **J. Dent. Res.,** v. 86, n. 10, p. 927-936, Oct 2007. ISSN 0022-0345.

DAVIS, D. A. et al. Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. **Blood,** v. 105, n. 12, p. 4561-4568, Jun 2005. ISSN 0006-4971.

DENKER, S. P.; BARBER, D. L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. **J. Cell Biol.,** v. 159, n. 6, p. 1087-1096, Dec 2002. ISSN 0021-9525.

DURHAM, J. T.; HERMAN, I. M. Inhibition of angiogenesis in vitro: a central role for beta-actin dependent cytoskeletal remodeling. **Microvasc. Res.,** v. 77, n. 3, p. 281-288, May 2009. ISSN 1095-9319.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N. Engl. J. Med.,** v. 315, n. 26, p. 1650-1659, Dec 1986. ISSN 0028-4793.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.,** v. 237, p. 97-132, 1999. ISSN 0070-217X.

DÉLOT, E.; BON, C. Differential effects of presynaptic phospholipase A2 neurotoxins on Torpedo synaptosomes. **J. Neurochem.,** v. 58, n. 1, p. 311-319, Jan 1992. ISSN 0022-3042.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **J. Clin. Invest.,** v. 103, n. 9, p. 1227-1230, May 1999. ISSN 0021-9738.

_____. Adhesion events in angiogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 13, n. 5, p. 563-568, Oct 2001. ISSN 0955-0674.

ENGBRING, J. A.; KLEINMAN, H. K. The basement membrane matrix in malignancy. **J. Pathol.,** v. 200, n. 4, p. 465-470, Jul 2003. ISSN 0022-3417.

FAIAD, O. J. **Efeito da crotoxina sobre a função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral**. São Paulo. 2012

FAIAD, O. J.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C. **Lipoxin A4 contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor**: Annual Scientific Meeting. 65**:** 8.04 p. 2008.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β-neurotoxin. **J. Mol. Biol.,** v. 412, n. 2, p. 176-191, Sep 2011. ISSN 1089-8638.

FIERRO, I. M.; KUTOK, J. L.; SERHAN, C. N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 300, n. 2, p. 385-392, Feb 2002. ISSN 0022-3565.

FIORE, S. et al. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. **J. Exp. Med.,** v. 180, n. 1, p. 253-260, Jul 1994. ISSN 0022-1007.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Adv. Cancer. Res.,** v. 43, p. 175-203, 1985. ISSN 0065-230X.

_____. The role of angiogenesis in tumor growth. **Semin. Cancer Biol.,** v. 3, n. 2, p. 65-71, Apr 1992. ISSN 1044-579X.

_____. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat. Ver. Drug Discov.,** v. 6, n. 4, p. 273-286, Apr 2007. ISSN 1474-1776.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys,** v. 60, n. 1, p. 64-73, Jan 1956. ISSN 0003-9861.

FRANCELINO, A. **Estudo da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular nas células endoteliais tímicas e sua participação na migração**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Alagoas. 2008

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmacol,** v. 20, n. 7, p. 1549-1556, Jul 1971. ISSN 0006-2952.

GOMES, F. G. et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. **Life Sci,** v. 92, n. 2, p. 101-107, Feb 2013. ISSN 1879-0631.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon,** v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984. ISSN 0041-0101.

GORDON, S. Biology of the macrophage. **J. Cell Sci. Suppl.,** v. 4, p. 267-286, 1986. ISSN 0269-3518.

_____. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005. ISSN 1474-1733.

GRIMSHAW, M. J.; WILSON, J. L.; BALKWILL, F. R. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. **Eur. J. Immunol.,** v. 32, n. 9, p. 2393-2400, Sep 2002. ISSN 0014-2980.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell,** v. 86, n. 3, p. 353-364, Aug 1996. ISSN 0092-8674.

HAUPTMANN, S. et al. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. **Am. J. Pathol.,** v. 143, n. 5, p. 1406-1415, Nov 1993. ISSN 0002-9440.

HE, Y. et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. **Cancer Res.,** v. 65, n. 11, p. 4739-4746, Jun 2005. ISSN 0008-5472.

HENDRIKS, J.; RIESLE, J.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Co-culture in cartilage tissue engineering. **J. Tissue Eng. Regen. Med.,** v. 1, n. 3, p. 170-178, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1932-6254.

HERRERA, D. R. et al. Root canal content from primary endodontic infection and upregulation of gelatinases in fibroblast cells. **Int. Endod. J.**, Dec 2014. ISSN 1365-2591.

HOLLBORN, M. et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,** v. 48, n. 9, p. 4360-4367, Sep 2007. ISSN 0146-0404.

HOTCHKISS, K. A. et al. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. **Mol. Cancer Ther.,** v. 1, n. 13, p. 1191-1200, Nov 2002. ISSN 1535-7163.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in Snake Venom. In: LEE, C. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.52, 1979. cap. 4, p.61-158.

JEDINAK, A.; DUDHGAONKAR, S.; SLIVA, D. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. **Immunobiology,** v. 215, n. 3, p. 242-249, Mar 2010. ISSN 1878-3279.

KATO, E. et al. **Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vivo assay.** XII Simpósio

Brasileiro de Matriz Extracelular/ VII Internacional Symposium on Extracellular Matrix**:** 44 p. 2013.

KLIMP, A. H. et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.,** v. 44, n. 2, p. 143-161, Nov 2002. ISSN 1040-8428.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science,** v. 258, n. 5089, p. 1798-1801, Dec 1992. ISSN 0036-8075.

LADOUX, B.; NICOLAS, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. **Rep. Prog. Phys.,** v. 75, n. 11, p. 116601, Nov 2012. ISSN 1361-6633.

LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, B. A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.,** v. 80, n. 4, p. 705-713, Oct 2006. ISSN 0741-5400.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ. Res.,** v. 100, n. 6, p. 782-794, Mar 2007. ISSN 1524-4571.

LEE, C.-C.; LIU, K.-J.; HUANG, T.-S. Tumor-Associated Macrophage: Its Role in Tumor Angiogenesis. **J. Cancer Mol.** 2(4)**:** 135-140 p. 2006.

LEE, C.-Y. Snake Venoms. In: (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.52, 1979

LEEDOM, A. J. et al. Endogenous LXA4 circuits are determinants of pathological angiogenesis in response to chronic injury. **Am. J. Pathol.,** v. 176, n. 1, p. 74-84, Jan 2010. ISSN 1525-2191.

LEIBOVICH, S. J. et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. **Nature,** v. 329, n. 6140, p. 630-632, 1987 Oct 15-21 1987. ISSN 0028-0836.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res.,** v. 66, n. 2, p. 605-612, Jan 2006. ISSN 0008-5472.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.,** v. 2, n. 10, p. 790-802, Oct 2003. ISSN 1474-1776.

LINDE, N. et al. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. **J. Pathol.,** v. 227, n. 1, p. 17-28, May 2012. ISSN 1096-9896.

LÄMMERMANN, T. et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. **Nature,** v. 453, n. 7191, p. 51-55, May 2008. ISSN 1476-4687.

MACKANESS, G. B. The mechanism of macrophage activation. In: MUDD, S. (Ed.). **Infectious agents and host reactions**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1970. p.61.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.,** v. 229, n. 2, p. 176-185, Jan 2013. ISSN 1096-9896.

_____. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today,** v. 13, n. 7, p. 265-270, Jul 1992. ISSN 0167-5699.

_____. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.,** v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec 2004. ISSN 1471-4906.

_____. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.,** v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov 2002. ISSN 1471-4906.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon,** v. 36, n. 12, p. 1749-1800, Dec 1998. ISSN 0041-0101.

MCMAHON, B.; GODSON, C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.,** v. 286, n. 2, p. F189-201, Feb 2004. ISSN 1931-857X.

MEEROVITCH, K. et al. A novel RGD antagonist that targets both alphavbeta3 and alpha5beta1 induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. **Vascul. Pharmacol.,** v. 40, n. 2, p. 77-89, Feb 2003. ISSN 1537-1891.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **J. Immunol.,** v. 180, n. 7, p. 4639-4647, Apr 2008. ISSN 0022-1767.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. **J. Cell Physiol.,** v. 77, n. 2, p. 277-280, Apr 1971. ISSN 0021-9541.

MIRANTI, C. K. Application of cell adhesion to study signaling networks. **Methods Cell Biol.,** v. 69, p. 359-383, 2002. ISSN 0091-679X.

MOORE, K. A. et al. Control of basement membrane remodeling and epithelial branching morphogenesis in embryonic lung by Rho and cytoskeletal tension. **Dev. Dyn.,** v. 232, n. 2, p. 268-281, Feb 2005. ISSN 1058-8388.

MOORE, M. A.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br. J. Haematol.,** v. 18, n. 3, p. 279-296, Mar 1970. ISSN 0007-1048.

NAHAS, L.; MACFARLANE, R. G.; DENSON, K. W. A STUDY OF THE COAGULANT ACTION OF EIGHT SNAKE VENOMS. **Thromb. Diath. Haemorrh.,** v. 12, p. 355-367, Dec 1964. ISSN 0340-5338.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.,** v. 79, n. 2, p. 319-326, Feb 1987. ISSN 0021-9738.

NAYLOR, M. S. et al. Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. **Int. J. Cancer,** v. 58, n. 1, p. 50-56, Jul 1994. ISSN 0020-7136.

NOGUERA, R. et al. Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment. An update and overview. **Histol. Histopathol.,** v. 27, n. 6, p. 693-705, Jun 2012. ISSN 1699-5848.

ONIMARU, M.; YONEMITSU, Y. Angiogenic and lymphangiogenic cascades in the tumor microenvironment. **Front Biosci. (Schol. Ed.),** v. 3, p. 216-225, 2011. ISSN 1945-0524.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci.,** v. 99, n. 8, p. 1501-1506, Aug 2008. ISSN 1349-7006.

PARKINSON, J. F. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. **Inflamm. Allergy Drug Targets,** v. 5, n. 2, p. 91-106, Apr 2006. ISSN 1871-5281.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,** v. 11, n. 9, p. 633-643, Sep 2010. ISSN 1471-0080.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancer,** v. 4, n. 1, p. 71-78, Jan 2004. ISSN 1474-175X.

_____. Trophic macrophages in development and disease. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 9, n. 4, p. 259-270, Apr 2009. ISSN 1474-1741.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends Genet,** v. 25, n. 1, p. 30-38, Jan 2009. ISSN 0168-9525.

RAHAT, M. A.; HEMMERLEIN, B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Front. Physiol.,** v. 4, p. 144, 2013. ISSN 1664-042X.

RAMOS, F. **Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Alagoas. 2008

RANGEL-SANTOS, A. et al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus cascavella and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon,** v. 43, n. 7, p. 801-810, Jun 2004. ISSN 0041-0101.

REINHART-KING, C. A. Endothelial cell adhesion and migration. **Methods Enzymol.,** v. 443, p. 45-64, 2008. ISSN 1557-7988.

RIABOV, V. et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Front. Physiol.,** v. 5, p. 75, 2014. ISSN 1664-042X.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science,** v. 302, n. 5651, p. 1704-1709, Dec 2003. ISSN 1095-9203.

ROSENFELD, G. **Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido.** São Paulo: *Mem. Inst. Butantan*. 20**:** 329-335 p. 1947.

_____. Symptomatology, Pathology, and Treatment of Snake Bites in South America. In: BÜCHERL, W. e BUCKLEY, E. E. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, v.2, 1971 cap. 34, p.345-384.

SAMPAIO, S. C. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon,** v. 47, n. 3, p. 313-321, Mar 2006. ISSN 0041-0101.

_____. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom on macrophage function. **Toxicon,** v. 41, n. 7, p. 899-907, Jun 2003. ISSN 0041-0101.

_____. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon,** v. 55, n. 6, p. 1045-1060, Jun 2010. ISSN 1879-3150.

_____. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon,** v. 47, n. 8, p. 909-919, Jun 2006. ISSN 0041-0101.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (Crotalus durissus) in Brazil. **QJM,** v. 94, n. 10, p. 551-559, Oct 2001. ISSN 1460-2725.

SANTOS, K. F. et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A2. **Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun,** v. 63, n. Pt 4, p. 287-290, Apr 2007. ISSN 1744-3091.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 81, n. 17, p. 5335-5339, Sep 1984. ISSN 0027-8424.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin. Cancer Biol.,** v. 18, n. 5, p. 349-355, Oct 2008. ISSN 1096-3650.

SINAN. **Acidente por Animais Peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação** 2013.

SIVEEN, K. S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunol. Lett.,** v. 123, n. 2, p. 97-102, Apr 2009. ISSN 1879-0542.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. **Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel**: Mem. Inst. Butantan. 56**:** 505-512 p. 1938.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metab.,** v. 19, n. 1, p. 21-36, Jan 2014. ISSN 1932-7420.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: RATON, B. (Ed.). **Medical Use of Snake Venom**. Florida, 1990. cap. 2, p.33-56.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.,** v. 246, n. 1 Pt 1, p. C1-9, Jan 1984. ISSN 0002-9513.

TANAKA, Y. et al. Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer. **Hum. Pathol.,** v. 33, n. 11, p. 1105-1113, Nov 2002. ISSN 0046-8177.

TANEN, D. A. et al. Rattlesnake envenomations: unusual case presentations. **Arch. Intern. Med.,** v. 161, n. 3, p. 474-479, Feb 2001. ISSN 0003-9926.

TARLING, J. D.; LIN, H. S.; HSU, S. Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. **J. Leukoc. Biol.,** v. 42, n. 5, p. 443-446, Nov 1987. ISSN 0741-5400.

UENO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin. Cancer Res.,** v. 6, n. 8, p. 3282-3289, Aug 2000. ISSN 1078-0432.

VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.,** v. 79, p. 125-150, 1989. ISSN 0070-2188.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.,** v. 128, n. 3, p. 415-435, Sep 1968. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R.; DIESSELHOFF-DEN DULK, M. C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med.,** v. 138, n. 6, p. 1314-1330, Dec 1973. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R.; DIESSELHOFF-DEN DULK, M. M. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. **J. Exp. Med.,** v. 132, n. 4, p. 813-828, Oct 1970. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R. et al. Characteristics, Origin and Kinetics of Human and Murine Mononuclear Phagocytose In: VAN FURTH, R. (Ed.). **Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects** London: Martinus Nijhoff Publishers by, The Hague, 1980. cap. 9, p.279-298.

VAN OVERMEIRE, E. et al. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallelisms with other tissues. **Front. Immunol.,** v. 5, p. 127, 2014. ISSN 1664-3224.

VENNERI, M. A. et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. **Blood,** v. 109, n. 12, p. 5276-5285, Jun 2007. ISSN 0006-4971.

VIEIRA, A. M. et al. ATL-1, a synthetic analog of lipoxin, modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism. **Biochem. Pharmacol.,** v. 90, n. 4, p. 388-396, Aug 2014. ISSN 1873-2968.

WALTER, F. G.; BILDEN, E. F.; GIBLY, R. L. Envenomations. **Crit. Care Clin.,** v. 15, n. 2, p. 353-386, ix, Apr 1999. ISSN 0749-0704.

WANG, X. et al. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. **J. Transl. Med.,** v. 4, p. 30, 2006. ISSN 1479-5876.

_____. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. **Cancer Sci.,** v. 104, n. 4, p. 516-523, Apr 2013. ISSN 1349-7006.

WANG, X. H. et al. Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. **Life Sci.,** v. 84, n. 7-8, p. 240-249, Feb 2009. ISSN 0024-3205.

WERB, Z. et al. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell Biol.,** v. 102, n. 3, p. 697-702, Mar 1986. ISSN 0021-9525.

WHITE, E. S. et al. Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. **J. Immunol.,** v. 166, n. 12, p. 7549-7555, Jun 2001. ISSN 0022-1767.

WHITELAW, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. **Blood,** v. 28, n. 3, p. 455-464, Sep 1966. ISSN 0006-4971.

WILLIAMS, R. L.; COURTNEIDGE, S. A.; WAGNER, E. F. Embryonic lethalities and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. **Cell,** v. 52, n. 1, p. 121-131, Jan 1988. ISSN 0092-8674.

WU, S. H. et al. Lipoxin A4 inhibits TNF-alpha-induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells. **Kidney Int.,** v. 68, n. 1, p. 35-46, Jul 2005. ISSN 0085-2538.

ZARIC, J.; RÜEGG, C. Integrin-mediated adhesion and soluble ligand binding stabilize COX-2 protein levels in endothelial cells by inducing expression and preventing degradation. **J. Biol. Chem.,** v. 280, n. 2, p. 1077-1085, Jan 2005. ISSN 0021-9258.

ZHANG, B. et al. M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. **Clinics (Sao Paulo),** v. 67, n. 8, p. 901-906, Aug 2012. ISSN 1980-5322.