MARIANA DO NASCIMENTO VIANA

Estudos de efeitos de uma metaloproteinase de veneno ofídico em células de músculo liso vascular: produção de fatores que modulam a migração e proliferação destas células e mecanismos envolvidos

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

**São Paulo
2018**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nascimento Viana, Mariana

Estudos de efeitos de uma metaloproteinase de veneno ofídico em células do músculo liso vascular: produção de fatores que modulam a migração e proliferação dessas células e mecanismos envolvidos / Mariana Nascimento Viana; orientador Catarina de Fátima Pereira Teixeira. -- São Paulo, 2018.

142 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Metaloproteinase. 2. Prostaglandina E2. 3. Migração. 4. Célula de músculo liso vascular. 5. Inflamação. I. de Fátima Pereira Teixeira, Catarina, orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Mariana do Nascimento Viana

Título da Tese: Estudo de efeitos de uma metaloproteinase de veneno ofídico em células de músculo liso vascular: Produção de fatores que modulam a migração destas células e mecanismos envolvidos

Orientador(a): Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 de metaloproteinase BaP1, isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, na expressão e produção de fatores que modulam a migração e proliferação de células de músculo liso vascular", protocolo nº 1128/13, sob a responsabilidade de Catarina de Fátima Pereira Teixeira e Mariana do Nascimento Viana - 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 11/9/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
09/2013 - 09/2018	
Laboratório de Farmacologia	132 ratos Wistar 90d - 190 a 230g (M,F)

São Paulo, 30 de setembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudos de efeitos de uma metaloproteinase de veneno ofídico em células do músculo liso vascular: produção de fatores que modulam a migração e proliferação dessas células e mecanismos envolvidos*", registrado sob o protocolo nº **115/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **16/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Catarina de Fátima Pereira Teixeira**

- Membros da Equipe: *Cristina Maria Fernandes (Pesquisador colaborador), Karina Cristina Giannotti (Pós-graduando), Mariana do Nascimento Viana (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Studies on the effects induced by a snake venom metalloproteinase on vascular smooth muscle cells: production of migration and proliferation regulating factors and mechanisms involved*", protocol nº **115/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/16/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Catarina de Fátima Pereira Teixeira**

- Team members: **Cristina Maria Fernandes (Colaborator Researcher), Karina Cristina Giannotti (Graduate Student), Mariana do Nascimento Viana (Graduate Student)**

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Novergicus</i>	Wistar	Macho/Male	190-230 g	132

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

*Trabalho realizado na Unidade de Inflamação do Laboratório de
Farmacologia do Instituto Butantan, com auxílio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior (**CAPES**)*

DEDICATÓRIA

*Aos melhores pais, Marilda e Valdomiro,
Difícil escolher as palavras certas para demonstrar minha gratidão.
Agradeço por todo amor e incentivo. Por sempre me apoiarem, acreditarem
e se dedicarem tanto para a minha formação. São meus heróis, minha base!
Jamais esquecerei de tudo que fazem por mim. Obrigada por permitirem que eu continuasse
na jornada científica. Continuo me espelhando em vocês. Amo vocês!*

*Aos meus queridos irmãos, Cristina, Emerson e Luciana,
Tenho muito a agradecer, por sempre me incentivarem, por demonstrarem tanto apreço por
meu trabalho. Pela paciência e amor. Por sempre demonstrarem aquele orgulho e felicidade
quando eu falo da ciência. Obrigada pela compreensão, por sempre me apoiarem em todos
os momentos! Amo muito vocês.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dra. Catarina Teixeira**, por toda confiança e dedicação para que este trabalho concluído. Muito obrigada pela liberdade concedida para concepção do projeto, pela oportunidade e tempo dedicado. Agradeço também pela paciência e compreensão em um dos períodos mais “complicados” da minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelo carinho, pelo apoio, pelos conselhos e pela inspiração. De coração, agradeço imensamente.

Ao **Dr. Jose Maria Gutierrez**, pela doação da toxina BaP1 utilizada neste estudo.

À **Dra Maria Cristina Fernandes**, por ter ensinado a dar os primeiros passos da vida científica. Por toda força e apoio durante a realização deste projeto. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelas conversas e pelo grande incentivo. Agradeço muito pela nossa convivência e amizade.

Ao **Dr Elbio Leiguez Junior**, pela imensa força e paciência comigo. Obrigada por todos os seus conselhos e discussões. Agradeço a troca de informações e por todas as dicas. Nossas longas conversas e risadas, nos fazem hoje verdadeiros amigos. Muito obrigada!

Ao **Dr Márcio Matsubara**, pela grande ajuda e discussões na fase inicial deste projeto.

Á **Dr Karina Cristina Giannotti**, pelas nossas discussões, pelo compartilhamento de ideias e pelas conversas noturnas. Obrigada por colaborar de forma ativa para que esse trabalho fosse concluído, pelos conselhos e pela amizade.

À **Dr Neide Galvão do Nascimento** obrigada por toda ajuda, conselhos, conversas, muitas risadas e pela ótima convivência.

À **Dra. Vanessa Moreira**, pela disposição em ajudar sempre que necessário, pelas conversas e conselhos.

À **Priscilla Motta**, por nossas conversas, risadas, amizade, por transmitir energia positiva ao nosso laboratório e, claro, pela ajuda no inglês.

Aos alunos novos do laboratório de inflamação, **Camila, Rodrigo, Danilo, Karen e Giovanna** pela ajuda para que este projeto fosse finalizado. Obrigada por tornarem os nossos dias de trabalho mais alegres.

Às minhas queridas amigas **Andréia** e **Juliana**, por todas as nossas conversas, conselhos, desabafos. Com vocês, os meus dias se tornaram adoráveis.

Aos **alunos do laboratório de Farmacologia**, em especial Adriana, Natália e Lucas, pela troca de experiências do mesmo momento que compartilhamos e pela agradável convivência.

Aos **pesquisadores do laboratório de Farmacologia** pelo bom convívio.

Aos **funcionários do laboratório de Farmacologia**, em especial, às queridas Renata e Eliza, por todo apoio “atrás dos bastidores”.

Aos **docentes do Programa de Pós Graduação em Imunologia**, que fizeram com que nós, alunos, aprofundássemos nossos conhecimentos sobre o universo do sistema imune.

À **Maria Eni**, secretária da Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, sempre pronta para resolver os problemas e atenciosas com os alunos.

Ao **Instituto de Ciências Biomédicas (USP)** e ao **Laboratório de Farmacologia (Instituto Butantan)**, pela estrutura e oportunidade de realizar este trabalho.

À **Dr Thaís** pela ajuda no isolamento das células de músculo liso de ratos.

Ao **Dr Jorge**, do Instituto Butantan, pela ajuda nos ensaios de citometria de fluxo.

Ao **Dr Durvanei**, do laboratório de bioquímica do Instituto Butantan, pelo auxílio nos ensaios de ciclo celular.

À **Meire**, do Instituto de Ciências Biomédicas, pela ajuda nos ensaios de multiplex.

Ao meu companheiro de todas as horas, **Giuseppe**. Obrigada por todo o carinho e compreensão. Agradeço o companheirismo e amor!

Aos **meus amigos** “extra Instituto”, que sempre entenderam os meus momentos de distância e mesmo assim permaneceram ao meu lado.

Obrigada aos **animais** que foram utilizados, para que mais um projeto fosse finalizado.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)

RESUMO

VIANA, M. N. **Estudos de efeitos de uma metaloproteinase de veneno ofídico em células do músculo liso vascular: produção de fatores que modulam a migração e proliferação dessas células e mecanismos envolvidos.** 2018. 142 f. Tese (Doutorado em: Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As metaloproteinases, abundantes em venenos de serpentes da família Viperidae, apresentam homologia estrutural e funcional com as metaloproteinases de mamíferos (MMPs), cujos níveis estão elevados em doenças de natureza inflamatória, como a aterosclerose. A metaloproteinase BaP1, do veneno da serpente *Bothrops asper*, apresenta potente atividade inflamatória e constitui ferramenta científica importante para o estudo das ações das MMPs. Durante a aterosclerose, as células de músculo liso vascular (CMLVs) mudam do fenótipo contrátil para sintético, migram para a camada subendotelial do vaso, liberam mediadores inflamatórios e expressam MMPs. No entanto, o papel destas enzimas na resposta inflamatória das CMLVs e a potencial relação deste efeito com a migração das mesmas, não foi esclarecida. Neste estudo, investigou-se os efeitos da BaP1 em CMLVs, quanto à 1) indução da migração; 2) liberação de diferentes classes de mediadores inflamatórios e expressão de moléculas de adesão; 3) indução da mudança fenotípica das CMLVs; 4) expressão e participação de enzimas de síntese de prostaglandinas e de receptores de PGE₂ na liberação deste eicosanoide; 5) participação de eicosanoides e da IL-1 β na migração e mudança de fenótipo das CMLVs. Os resultados obtidos, a partir dos ensaios de *transwell* e *wound healing*, mostraram que a BaP1(50nM) induziu a migração das CMLVs, após 48 h, mas não a proliferação celular, observada pelo ensaio de ciclo celular. Além disso, a metaloproteinase induziu aumento da liberação de PGE₂ (1-48h), LTB₄ (1-3h), IL-1 β (12-24h), MCP-1 (24-48h) e fractalcina (24-48h), mas não de PGI₂ e nem TXA₂, analisados por ensaios de EIA e multiplex. Ainda, a BaP1 aumentou a expressão proteica de COX-2 (1^o h) e de PGESm-1 (4^o h), analisada por *Western blotting*, e expressão gênica das sFLA₂-IIA (30 min) e cFLA₂-IVA (30 min), verificada por PCR em tempo real, sem alterar os níveis de COX-1, dos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4, de ICAM-1 e VCAM-1 e da iFLA₂. A intervenção farmacológica com os inibidores de COX-2 ou de FLA₂ intracelulares reduziu a liberação de PGE₂ induzida pela BaP1. Além disso, o pré-tratamento das células

com o inibidor da FLAP e com os antagonistas do receptor de IL-1 β ou do receptor EP3 reduziu a migração celular induzida pela BaP1. Esta metaloproteinase também induziu a mudança de fenótipo contrátil para o sintético, das CMLVs, verificada pela diminuição da expressão de α -actina pelo ensaio de citometria de fluxo. A inibição da COX-2 e da FLAP não alterou este efeito. Este conjunto de dados demonstra a capacidade da BaP1 estimular diretamente as CMLVs para migração, liberação de mediadores inflamatórios e a expressão de COX-2, PGESm-1, sFLA₂-IIA e cFLA₂-IVA. A produção de PGE₂ induzida pela BaP1 depende das FLA₂s intracelulares, com ativação das vias da COX-1 e -2. A migração das CMLVs, induzida pela BaP1, depende da PGE₂ via ativação do receptor EP3, do LTB₄ e da IL-1 β . Ainda, esta metaloproteinase estimula a mudança fenotípica das CMLVs para o estágio sintético, em que as CMLVs migram e proliferam. Os dados deste estudo, ao demonstrarem que as metaloproteinases contribuem para o desenvolvimento de eventos inflamatórios, em CMLVs, apontam um papel adicional desta classe de enzimas em doenças de natureza inflamatória, como a aterosclerose.

Palavras-chave: Metaloproteinase. Prostaglandina E₂. Migração. Célula de músculo liso vascular. Inflamação.

ABSTRACT

VIANA, M. N. **Studies on the effects of an ophidian venom metalloproteinase in vascular smooth muscle cells: production of factors that modulate cell migration and proliferation and mechanisms involved.** 2018. 142 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Metalloproteinases are abundant enzymes in Viperidae family snake venoms and exhibit structural and functional homology with mammalian matrix metalloproteinases (MMPs). The levels of these enzymes are increased in inflammatory diseases, such as atherosclerosis. The BaP1 metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom presents potent inflammatory activity and constitutes an important scientific tool for the study of the actions of MMPs. During atherosclerosis, vascular smooth muscle cells (VSMCs) switch their phenotype from a contractile to a synthetic state, migrate into the subendothelial vessel layer, release inflammatory mediators and express high levels of MMPs. However, the role of these enzymes in the inflammatory response of VSMCs and the potential relationship of this effect with cell migration have not been clarified. In this study, we investigated the effects of BaP1 on CMLVs with focus on: 1) induction of cell migration; 2) release of different classes of inflammatory mediators and protein expression of adhesion molecules; 3) induction of VSMCs phenotype switching; 4) expression and participation of prostaglandin synthesis enzymes and PGE₂ receptors in the release of this eicosanoid; 5) participation of eicosanoids and IL-1 β in migration and phenotype switching of VSMCs. Results obtained from the transwell and wound healing assays showed that BaP1 (50nM) induced VSMCs migration after 48 h, but not cell proliferation, observed by the cell cycle assay. In addition, this metalloproteinase caused release of PGE₂ (1-48h), LTB₄ (1-3h), IL-1 β (12-24h), MCP-1 (24-48h) and fractalkine (24-48h), but not PGI₂ and TXA₂, analyzed by EIA and multiplex assays. Furthermore, BaP1 increased protein expression of COX-2 (1 h) and PGESm-1 (4 h), analyzed by western blotting and gene expression of sFLA₂-IIA (30 min) and cFLA₂-IVA (30 min), evaluated by real-time PCR, without altering COX-1, EP1, EP2, EP3 and EP4, ICAM-1 and VCAM-1 and iFLA₂ levels. Pharmacological intervention with COX-2 or intracellular FLA₂ inhibitors reduced PGE₂ release induced by BaP1. In addition, pretreatment of cells with either a FLAP inhibitor, or IL-1 β receptor, or EP3 receptor antagonist reduced cell migration induced by BaP1. This metalloproteinase also induced conversion of

contractile VSMCs to a synthetic phenotype, as evidenced by decrease of α -actin expression, analyzed by flow cytometry assay. Inhibition of COX-2 and FLAP did not alter this effect. Altogether, these data demonstrate the ability of BaP1 to directly stimulate VSMCs for migration, release of inflammatory mediators and expression of COX-2, PGESm-1, sFLA₂-IIA and cFLA₂-IVA. PGE₂ production induced by BaP1 depends on the intracellular FLA₂s, with activation of COX-1 and -2 pathways. VSMCs migration induced by BaP1 depends on PGE₂ via EP₃ receptor engagement, LTB₄ and IL-1 β . Furthermore, this metalloproteinase stimulates VSMCs phenotypic switching to a synthetic phenotype, in which these cells migrate and proliferate. These data demonstrate that metalloproteinases can contribute to the development of inflammatory events in VSMCs, evidencing an additional role of this class of enzymes in inflammatory diseases, such as atherosclerosis.

Keywords: Metalloproteinase. Prostaglandin E₂. Migration. Vascular smooth muscle cells. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura esquemática e classificação das metaloproteinases do veneno de serpentes com base em seus domínios estruturais.....	27
Figura 2-	Caracterização das células de músculo liso vascular de cultura primária da artéria aorta de ratos.....	47
Figura 3-	Efeito da BaP1 na atividade metabólica de CMLVs.....	49
Figura 4-	Efeito da BaP1 na integridade da membrana celular de CMLVs em cultura.....	50
Figura 5-	Efeito de diferentes concentrações da BaP1 na migração de células de músculo liso vascular, avaliado pelo ensaio de <i>wound healing</i>	52
Figura 6-	Efeito de diferentes concentrações da BaP1 na migração de células de músculo liso vascular, avaliado pelo ensaio de <i>transwell</i>	54
Figura 7-	Decurso temporal da migração de células de músculo liso vascular estimuladas com a BaP1, analisado pelo ensaio de <i>wound healing</i>	56
Figura 8-	Decurso temporal da migração de células de músculo liso vascular estimuladas com a BaP1, analisado pelo ensaio de <i>transwell</i>	58
Figura 9-	Efeito da BaP1 na distribuição das CMLVs nas diferentes fases do ciclo celular.....	60
Figura 10-	Efeito da BaP1 na expressão proteica de ICAM-1, em células de músculo liso vascular.....	62
Figura 11-	Efeito da BaP1 na expressão proteica de VCAM-1, em células de músculo liso vascular.....	64
Figura 12-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de IL-1 β por células de músculo liso vascular.....	65
Figura 13-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de MCP-1 por células de músculo liso vascular.....	66
Figura 14-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de fractalcina por células de músculo liso vascular.....	67
Figura 15-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de PGE ₂ por células de músculo liso vascular.....	69
Figura 16-	Decurso temporal do efeito da BaP1 sobre a liberação de PGI ₂ por células de músculo liso vascular.....	70
Figura 17-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de TXA ₂ por células de músculo liso vascular.....	71

Figura 18-	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de LTB ₄ por células de músculo liso vascular.....	72
Figura 19-	Expressão proteica de α -actina em CMLVs incubadas com a BaP1	74
Figura 20-	Expressão proteica de COX-1 e -2 em CMLVs estimuladas pela BaP1.....	76
Figura 21-	Expressão proteica de PGESm-1 em células de músculo liso vascular incubadas com a BaP1.....	78
Figura 22-	Efeito dos compostos valeril salicilato e NS398 na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em CMLVs.....	80
Figura 23-	Expressão protéica dos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 em CMLVs estimuladas pela BaP1.....	82
Figura 24-	Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 e EP4, AH6809 e GW627368X, na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em CMLVs em cultura.....	83
Figura 25-	Expressão gênica de sPLA ₂ IIA em CMLVs estimuladas pela BaP1	84
Figura 26-	Expressão gênica de cPLA ₂ IVA em CMLVs estimuladas pela BaP1.....	85
Figura 27-	Expressão gênica de cPLA ₂ IVA em CMLVs estimuladas pela BaP1.....	85
Figura 28-	Efeito dos compostos AACOCF3 e KH064 na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em CMLVs em cultura.....	87
Figura 29-	Efeito dos compostos valeril salicilato e NS398 na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1, avaliada pelo ensaio de <i>wound healing</i>	90
Figura 30-	Efeito dos compostos SC 19220, AH6809, L7 98106 e GW627368X, na migração das CMLVs induzidas pela BaP1, avaliada pelo ensaio de <i>transwell</i>	92
Figura 31-	Efeito dos compostos SC 19220, AH6809, L7 98106 e GW627368X, na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1, pelo ensaio de <i>wound healing</i>	95
Figura 32-	Efeito dos compostos SC 19220, AH6809, L7 98106 e GW627368X, na migração das CMLVs induzidas pela BaP1 pelo ensaio de <i>transwell</i>	98
Figura 33-	Efeito dos compostos KH064 e AACOCF3, na migração das CMLVs induzidas pela BaP1, avaliada pelo ensaio de <i>wound healing</i>	101

Figura 34-	Efeito do composto MK886 na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1, avaliada pelo ensaio de <i>wound healing</i>	103
Figura 35-	Efeito do composto MK886 na migração das CMLVs induzida pela BaP1.....	105
Figura 36-	Efeito do composto anakinra na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1, avaliada pelo ensaio de <i>wound healing</i>	107
Figura 37-	Liberação da PGE ₂ induzida pela BaP1 em CMLVs em estágio contrátil. Efeito do composto NS398 nesta liberação.....	108
Figura 38-	Efeito dos compostos SC-560 e NS398 na expressão proteica de α -actina em CMLVs incubadas com a BaP1.....	110
Figura 39-	Efeito dos compostos MK886 e BAY-X-1005 na expressão proteica de α -actina em CMLVs incubadas com a BaP1.....	112

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

MMPs- Metaloproteinases matriciais

ADAMs- *A disintegrin and metalloproteinases*

MVs- Metaloproteinases de venenos de serpentes

TIMPs- *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

PGE₂- Prostaglandina E₂

PGI₂- Prostaciclina

TXA₂- Tromboxana A₂

LTB₄- Leucotrieno B₄

FLA₂- Fosfolipase A₂

COX- Ciclooxygenase

PGESm-1- Prostaglandina E Sintase microssomal-1

ICAM-1 – *intercelular adhesion molecule 1*

VCAM-1- *Vascular cell adhesion molecule 1*

E.P.M- Erro padrão da média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.2	Metaloproteinase- Considerações gerais	24
2.3	Célula de músculo liso vascular- Características fisiológicas e fisiopatológicas	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Gerais	36
3.2	Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Animais	37
4.2	Metaloproteinase de veneno	37
4.3	Obtenção e cultivo de células musculares lisas vasculares (CMLVs) de ratos	37
4.4	Caracterização das culturas de CMLVs – Ensaio de citometria de fluxo .	38
4.5	Determinação da atividade metabólica: redução do brometo de 3-(4,5- dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT)	39
4.6	Determinação da atividade da desidrogenase láctica (LDH)	39
4.7	Ensaio de migração celular	39
4.7.1	Ensaio de <i>wound healing</i>	39
4.7.2	Ensaio de <i>transwell</i>	40
4.7.2.1	Coloração das células de músculo liso vascular por hematoxilina	40
4.8	Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	41

4.9	Determinação da concentração de IL-1 β , IL-6, MCP-1 e fractalcina	41
4.10	Determinação das concentrações dos prostanoídes PGE ₂ , PGI ₂ e tromboxana A ₂ (TXA ₂) e do leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	41
4.11	Determinação da expressão proteica das COX -1, COX-2, PGESm-1 e dos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 em CMLVs de ratos	42
4.12	Determinação da expressão gênica de fosfolipases A ₂ em CMLVs de ratos	42
4.13	Tratamentos farmacológicos	44
4.14	Análise estatística	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Caracterização de células de músculo liso vascular em cultura: Presença da proteína α -actina	46
5.2	Efeito da BaP1 na viabilidade de células de músculo liso vascular	48
5.3	Efeito de diferentes concentrações de BaP1 na migração de células de músculo liso vascular	51
5.4	Decurso temporal do efeito da BaP1 na migração de células de músculo liso vascular	55
5.5	Distribuição das células de músculo liso vascular estimuladas pela BaP1 nas fases do ciclo celular	59
5.6	Efeito da BaP1 na expressão proteica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em células de músculo liso vascular	61
5.7	Decurso temporal do efeito da BaP1 sobre a liberação das citocinas IL-1 β e TNF- α por células de músculo liso vascular	65
5.8	Decurso temporal do efeito da BaP1 sobre a liberação das quimiocinas MCP-1 e fractalcina por células de músculo liso vascular	66

5.9	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação dos prostanoídes	68
5.10	Decurso temporal do efeito da BaP1 na liberação de LTB ₄ por células de músculo liso vascular	72
5.11	Efeito da BaP1 na mudança de fenótipo das células de músculo liso vascular	73
5.12	Efeito da BaP1 na expressão proteica das ciclooxigenases-1 e -2 (COX-1 e -2) e em células de músculo liso vascular em cultura	75
5.13	Efeito da BaP1 na expressão proteica da Prostaglandina E Sintase Microssomal- 1 (PGESm-1) em células de músculo liso vascular	77
5.14	Efeito dos compostos valeril salicilato e NS398 na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em células de músculo liso vascular	79
5.15	Efeito da BaP1 na expressão proteica dos receptores de PGE ₂ em células de músculo liso vascular	81
5.16	Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 e EP4, AH6809 e GW627368X, na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em células de músculo liso vascular	83
5.17	Efeito da BaP1 na expressão gênica das fosfolipases A ₂ em células de músculo liso vascular	84
5.18	Efeito dos compostos AACOCF3 e KH064 na liberação de PGE ₂ induzida pela BaP1 em células de músculo liso vascular	86
5.19	Efeito dos compostos valeril salicilato e NS398 na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1	88
5.20	Efeito dos compostos SC 19920, AH6809, L7 98106 e GW627368X, na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1.....	93
5.21	Efeito dos compostos AACOCF3 e KH064 na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1	99

5.22	Efeito do composto MK886 na migração das células de músculo liso vascular induzida pela BaP1	102
5.23	Efeito do composto anakinra na migração das células de músculo liso ..	106
5.24	Efeito da BaP1 na liberação de PGE ₂ em células de músculo liso vascular no estágio contrátil	108
5.25	Efeito dos compostos SC-560 e NS398 na mudança de fenótipo das células de músculo liso vascular	109
5.26	Efeito dos compostos MK886 e BAY-X-1005 na mudança de fenótipo das células de músculo liso vascular	111
6	DISCUSSÃO	113
7	CONCLUSÕES	122
8	REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes são misturas complexas de componentes orgânicos e inorgânicos. Os estudos sobre as ações desses componentes têm proporcionado a descoberta de várias moléculas, úteis para o entendimento de processos fisiológicos, fisiopatológicos e farmacológicos, além do desenvolvimento de novos fármacos e a adoção de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento de doenças humanas. Nesse sentido, as metaloproteinases representam uma classe importante de proteínas, encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metaloproteinases- Considerações Gerais

As **metaloproteinases** constituem uma classe de enzimas, que depende de íons metálicos, principalmente o zinco (Zn^{2+}), para a atividade catalítica e estão envolvidas na clivagem de componentes da matriz extracelular e da membrana basal, dentre os quais o colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (VISSE e NAGASE; 2003). Para a grande maioria delas, a estrutura do sítio catalítico apresenta uma sequência conservada de aminoácidos (histidina, ácido glutâmico, X, X, histidina, X, X, glicina, X, X, histidina – **HEXXHXXGXXH**), em que X representa qualquer resíduo de aminoácido, que se liga ao íon metálico. Essas enzimas são encontradas em vertebrados, invertebrados e plantas (WOLFSBERG et al., 1995; MASSOVA et al., 1998). Devido à ampla distribuição, as metaloproteinases foram divididas em 10 clãs, nos quais estão distribuídas 67 famílias e inúmeras subfamílias (<http://merops.sanger.ac.uk/>). De particular interesse é o clã MA (também conhecido como clã das metzincinas), em que estão incluídas as enzimas das famílias M10 e M12, por agruparem as metaloproteinases matriciais (MMPs), as metaloproteinases com domínio disintegrina adicional (ADAMs - *a disintegrin and metalloproteinase*) e as metaloproteinases de venenos de serpentes (MVs) (TAKEDA et al., 2012; WOLFSBERG et al., 1998; DAHLER et al., 1990; HOOPER, 1994; STOCKER e AULD, 1990).

As **MMPs** participam de processos fisiológicos importantes, como a remodelagem de tecidos, cicatrização, diferenciação, migração e apoptose celular (DELCLAUX et al., 1996; MURPHY e KNAUPER, 1997; ZHANG et al., 1998;

FRASER et al., 2001; FAVEEUW et al., 2001). O remodelamento controlado do tecido vascular, por exemplo, a partir da síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular, é mantido pelas MMPs. Estas, por sua vez, têm sua atividade regulada por inibidores teciduais, denominados TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) (GALIS et al., 1994; 1995). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de TIMPs e de MMPs, a atividade das metaloproteinases modifica-se e acarreta um desequilíbrio entre a síntese e degradação de componentes da matriz extracelular. Além da capacidade em hidrolisar componentes de matriz extracelular, as MMPs também são importantes para a proteólise de diversas moléculas não associadas à matriz, como mediadores solúveis e proteínas de superfície celular (JOHNSON, 2007). Dessa maneira, em condições em que há um aumento de atividade, as MMPs passam a ser importantes em diversas condições patológicas, tais como, a aterosclerose. As **ADAMs**, por sua vez, são expressas como proteínas transmembrânicas e são importantes em processos fisiológicos, como a coagulação, angiogênese e reprodução e em processos fisiopatológicos, como a inflamação (JIA et al., 1996; KRATZSCHMAR et al., 1996; WESKAMP et al., 1996; HOWARD et al., 1996; BLACK et al., 1997; GEARING et al., 1994). Em condições fisiológicas, as ADAMs são expressas, constitutivamente, em CMLVs. No entanto, após estímulos injuriosos, ocorre um aumento da expressão das mesmas neste tipo celular (DREYMUELLER et al., 2012). Nesse sentido, a enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ADAM-17 ou TACE, (*TNF- α Converting Enzyme*), contribui para o processo inflamatório, por sua capacidade de hidrolisar o precursor do TNF- α , acoplado à membrana celular, na posição Ala 76 - Val 77, liberando o domínio extracelular, ativo, do TNF- α (BLACK et al., 1997; GEARING et al., 1994). De modo similar às MMPs, a ADAM-17 tem sua expressão aumentada em lesões ateroscleróticas, em humanos e em modelos experimentais (CANAULT et al., 2006, 2007). Ainda, foi demonstrado que a ADAM-17 cliva outras moléculas de superfície celular, como o receptor de IL-6, a L-selectina, o TGF- β (*transforming growth factor*), HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*) e o ligante de receptor de quimiocina (CX3CL) (GARTON et al., 2001; HUNDHAUSEN et al., 2003; MULLBERG et al., 1993; SAHIN et al., 2004). Contudo, o papel das ADAMs na liberação de interleucinas, quimiocinas e prostanoídes ainda não são conhecidos.

No que se diz respeito às **metaloproteinases de venenos de serpentes (MVs)**, também denominadas de hemorraginas, sabe-se que estas enzimas estão presentes, em altas concentrações, nos venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae (CALVETE et al., 2007). Estas enzimas são relevantes na fisiopatologia do envenenamento, por apresentarem atividades fibrinolítica, procoagulante, mionecrótica e hemorrágica (BJARNASON e FOX, 1994; OWNBY, 1990). Além dessas atividades, as MVs induzem eventos inflamatórios, em modelos experimentais (ZYCHAR et al., 2010; FERNANDES et al., 2006; COSTA et al., 2002; CLISSA et al., 2001). Estas enzimas são sintetizadas na glândula do veneno como zimógenos, os quais são processados enzimaticamente, originando metaloproteinases ativas e, em alguns casos, os domínios isolados da molécula precursora (HITE et al., 1992; SHIMOKAWA et al., 1997). No que se refere à sequência de aminoácidos, as MVs foram agrupadas, inicialmente, em quatro classes estruturais, denominadas de PI a PIV (BJARNASON e FOX, 1995). No entanto, esta classificação sofreu modificações, uma vez que não foram encontrados transcritos para a classe PIV das metaloproteinases. Dessa maneira, foi sugerido por FOX e SERRANO (2008), que esta classe representa uma modificação pós-traducional da estrutura canônica da classe PIII dessas enzimas. Após o processamento do precursor, as MVs da classe PI apresentam somente o domínio protease, encontrado em todas as metaloproteinases. As enzimas da classe PII contêm um domínio adicional, do tipo disintegrina. As MVs da classe PIII, por sua vez, possuem um domínio adicional, rico em cisteína, ou, ainda, podem sofrer modificação pós-traducional e apresentarem um domínio adicional, do tipo-lectina (FOX e SERRANO, 2008). Estes autores relataram, ainda, que o precursor das metaloproteinases pode sofrer proteólise, nos vários sítios interdomínios, originando moléculas que contêm somente o domínio disintegrina, na presença ou ausência do domínio rico em cisteína, ou, apenas o domínio catalítico, seguido do domínio disintegrina, ou, dos domínios disintegrina e rico em cisteína, ou, ainda, as metaloproteinases completas, contendo todos os domínios. Assim, as metaloproteinases das classes PII e PIII foram subdivididas em subclasses e caracterizadas, detalhadamente, de acordo com as diferentes possibilidades de processamento proteolítico e formação de diferentes estruturas diméricas. A representação esquemática da classificação das MVs está demonstrada na **Figura 1**, a seguir:

Figura 1. Estrutura esquemática e classificação das metaloproteínas do veneno de serpentes com base em seus domínios estruturais. A classe PI de metaloproteínas é constituída por enzimas com peso molecular (PM) entre 20 e 30 kDa. A classe PII, por metaloproteínas com PM entre 30 e 60 kDa. A classe PIII é constituída por metaloproteínas com PM entre 60 e 100 kDa

Fonte: FOX e SERRANO, 2008.

As metaloproteínas de venenos de serpentes apresentam homologia estrutural com as MMPs e as ADAMs (BJARNARSON e FOX, 1995; para revisão vide TAKEDA et al., 2012). Nesse sentido, as MVs também são sintetizadas sob a forma de zimógenos e o sítio catalítico das mesmas apresenta uma sequência conservada de aminoácidos (OWNBY et al., 1990). Além disso, as MMPs, as MVs e as ADAMs, apresentam homologia funcional, desencadeando eventos similares, relacionados à atividade catalítica. Desse modo, foi demonstrado que a jararagina, uma metaloproteínase isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, hidrolisa o TNF- α recombinante, na mesma posição hidrolisada pela ADAM-17, acarretando a liberação do TNF ativo (MOURA-DA-SILVA et al., 1996). Adicionalmente, TORTORELLA et al. (1998) demonstraram que a atrolisina C, uma metaloproteínase

isolada do veneno da serpente *Crotalus atrox*, degrada a agrecana, um componente importante da cartilagem, de modo similar à ADAMT-11, que contém um domínio adicional trombospondina (ABBASZADE et al., 1999).

A **BaP1**, de interesse neste estudo, é uma metaloproteinase, que foi isolada do veneno da serpente *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995). Esta MV possui peso molecular de 22,7 kDa e pertence à classe PI das metaloproteinases, por apresentar apenas o domínio catalítico (WATANABE et al., 2003). A BaP1 apresenta 202 resíduos de aminoácidos, que incluem poucos resíduos de cisteína, tirosina, metionina e prolina e grande quantidade de ácido aspártico, leucina, ácido glutâmico e serina. O sítio catalítico desta toxina compreende quatro α -hélices e uma molécula de zinco, coordenada por átomos de nitrogênio de três histidinas, associados a uma molécula de água, ligada a um glutamato (WATANABE et al., 2003). A atividade enzimática da BaP1 é máxima em pH alcalino e termolábil para ações proteolítica e hemorrágica (WATANABE et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 1995).

Do ponto de vista de ações biológicas, a BaP1 apresenta atividade hemorrágica fraca, em relação a outras metaloproteinases isoladas deste veneno e de espécies relacionadas e não induz hemorragia sistêmica ou letalidade, após injeção intravenosa em murino (GUTIÉRREZ, et al., 1995; ESCALANTE et al., 2004). No entanto, a BaP1 exibe atividade proteolítica potente e ação fibrinogenolítica sobre a cadeia α_a do fibrinogênio e, em incubações a longo prazo, a BaP1, degrada a cadeia β_b desta proteína (WATANABE et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 1995; HERRERA et al., 2015). A BaP1 não é tóxica para culturas de células endoteliais murinas e humanas (RUCAVADO et al., 1995), queratinócitos (RUCAVADO et al., 1998) e nem para macrófagos murinos (RUCAVADO et al., 2002). Em modelos experimentais *in vivo*, a BaP1 induziu hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 1995, RUCAVADO et al., 1995; PEREÑES et al., 2013; CASTRO et al., 2014, GUTIÉRREZ et al., 2016), edema (PEREÑES et al., 2013) e mionecrose moderada, com regeneração deficiente do músculo esquelético (RUCAVADO et al., 1995; HERNÁNDEZ et al., 2011, HERRERA et al., 2015). Adicionalmente, esta metaloproteinase induziu inflamação local após sua injeção no coxim plantar e no músculo gastrocnêmio de camundongos (GUTIÉRREZ et al., 1995, RUCAVADO et al., 1995). Além disso, FARSKY et al. (2000) demonstraram que BaP1 induziu a

ativação do sistema do complemento e a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Ainda, estudos demonstraram que a BaP1 induziu o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (FERNANDES et al., 2006 e CASTRO et al., 2014), dependente da expressão de moléculas de adesão da família das integrinas (cadeia CD18) (FERNANDES et al., 2006). Na pele e tecido muscular de camundongos a BaP1 causou a liberação das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) (RUCAVADO et al., 2002), a ativação de MMP-2 em fibroblastos de humanos em cultura (SARAVIA-OTTEN et al., 2004) e a degradação de laminina e colágeno do tipo IV, no tecido auricular, na pele e no músculo cremaster de camundongos (JIMÉNEZ et al., 2008; HERRERA et al., 2015; HERRERA et al., 2016). A injeção intra-articular da BaP1, em ratos, desencadeou eventos inflamatórios, com a formação de edema e acúmulo de leucócitos na cavidade sinovial, acompanhada da liberação dos mediadores inflamatórios TNF- α e prostaglandina E₂ (PGE₂) e nocicepção, dependente da liberação destes mediadores (FERNANDES et al., 2007). No mesmo sentido, a injeção intradérmica e intraescrotal da BaP1 induziu aumento da permeabilidade vascular e rompimento da barreira endotelial de vênulas pós capilares, respectivamente, em camundongos (HERRERA et al., 2016).

Em síntese, o conjunto de informações acima demonstra a ação proinflamatória da BaP1 e evidencia esta metaloproteinase como uma ferramenta científica extremamente útil para estudos voltados à compreensão do papel das metaloproteinases em doenças de natureza inflamatória. No que se refere a aterosclerose, as MMPs foram relacionadas unicamente à progressão e ruptura da placa aterosclerótica, durante o processo inflamatório cardiovascular. No entanto, a potencial contribuição dessas enzimas para a inflamação cardiovascular ainda não foi investigado e demanda estudos a respeito.

2.2 Aterosclerose – Considerações Gerais

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, intimamente associada a doenças cardiovasculares, principais causadoras de morbidade e mortalidade em diversas regiões do mundo, acarretando consequências graves para o indivíduo acometido. (HOWARD et al., 1996; HU et al., 2004, TERVAERT, 2013; YIN et al., 2016). Até o momento, a gênese da aterosclerose é considerada multifatorial, e os fatores predisponentes mais comuns envolvem hipercolesterolemia, hipertensão,

diabetes mellitus, tabagismo e sedentarismo. Além disso, fatores internos, como problemas genéticos, relacionados ao metabolismo lipídico e mecanismos moleculares da inflamação, somados à ativação do sistema imune inato e adaptativo, são considerados importantes para o desenvolvimento e progressão dessa doença (SIMA et al., 2018; MORIYA, 2018). A aterosclerose é caracterizada por disfunção do endotélio e de células musculares lisas (CMLVs) dos vasos sanguíneos, com a ativação e infiltração de leucócitos circulantes para a camada íntima dos vasos. Este processo é acompanhado pela produção de mediadores inflamatórios, aumento do conteúdo lipídico em células musculares lisas e em macrófagos infiltrados e a proliferação das CMLVs. A progressão dessas alterações acarreta a formação da placa ateromatosa na parede dos vasos (MONTERO-VEJA, 2012; HANSSON e HERMANSSON, 2011; BEAUDEX et al., 2004).

Durante o processo aterosclerótico, as células endoteliais expressam uma variedade de moléculas de adesão que recrutam várias classes de leucócitos. Desta maneira, os monócitos circulantes aderem à superfície endotelial e migram para a camada íntima do vaso. Os monócitos/macrófagos infiltrados proliferam e passam a liberar citocinas próinflamatórias, fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (MMPs), que podem ativar as células endoteliais, células musculares lisas vasculares, monócitos/macrófagos, linfócitos, células dendríticas e mastócitos (LIBBY et al., 2010; SPRAGUE e KALIL, 2009; BEAUDEX et al., 2004). Nesta condição, as CMLVs liberam MMPs (YANAGI et al., 1992) e migram da túnica média para a região subendotelial do vaso, exibindo uma alta taxa proliferativa e de síntese da matriz extracelular, características importantes para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (ROSS, 1993; GLASS e WITZTUM, 2001; WATANABE e IKEDA, 2004). Neste sentido, foi demonstrado, em pacientes e em modelos experimentais, que as MMPs apresentam-se em níveis aumentados nas paredes dos vasos durante o processo aterosclerótico (ZALTSMAN e NEWBY, 1997; AIKAWA et al., 1998; GALLIS et al., 1994; 1995). As MMPs ativas, liberadas na artéria inflamada, degradam componentes da membrana basal e da matriz extracelular que circundam as células musculares. Este evento contribui para a migração das CMLVs da camada média para a camada subendotelial do vaso. Adicionalmente, essas enzimas processam fatores de crescimento, conectados à matriz extracelular, favorecendo a migração das células musculares lisas (LEMARIE et al., 2009; BRIONES et al., 2010). Neste contexto, estudos in vitro mostraram que a

secreção de MMPs, pelas CMLVs, facilitou o processo migratório destas células *in vitro* (BENDECK et al, 1994; UZUI et al., 2000; WANG et al., 2011). De outra parte, o aumento da expressão e da atividade de MMPs, em particular as MMP-2 e MMP-12, foi relacionado à hiperplasia da camada íntima do vaso, em consequência da proliferação excessiva das CMLVs (NEWBY e ZALTSMAN, 2000; DWIVEDI et al., 2008; CHO e REIDY, 2002). Além disso, o aumento da expressão e atividade de MMPs foi associado ao enfraquecimento e ruptura da placa aterosclerótica (BEAUDEX et al., 2004), processo responsável por infartos agudos do miocárdio. Estes dados, em conjunto, demonstram a ação autócrina das MMPs em CMLVs. No entanto, apesar da natureza inflamatória da aterosclerose, a relação das MMPs com desenvolvimento do processo inflamatório não é conhecido e justifica estudos a esse respeito.

2.3 Células do músculo liso vascular: características fisiológicas e fisiopatológicas

A CMLV é a principal célula presente na túnica média da parede dos vasos e assume diversas funções estruturais e fisiológicas. Esta célula é responsável pela regulação da pressão sanguínea e redistribuição do fluxo sanguíneo (LACOLLEY et al., 2012). As CMLVs são originadas a partir de diversos progenitores durante o desenvolvimento embrionário. A maioria destas células é derivada de populações do mesoderma local. No entanto, as CMLVs de grandes vasos (aorta ascendente e arcos branquiais) são derivadas da crista neural cranial, enquanto as encontradas na circulação da artéria coronária são derivadas de células migradas do epicárdio (HUNGERFORD e LITTLE, 1999). Na fase de desenvolvimento, as CMLVs exibem uma alta taxa de proliferação, migração e de produção de componentes da matriz extracelular (RZUCIDILO et al., 2007; LACOLLEY et al., 2012). Em artérias maduras normais, contudo, as CMLVs se diferenciam e assumem um fenótipo contrátil, caracterizado pela baixa taxa proliferativa, baixa atividade sintética e expressam um repertório específico de proteínas contráteis (miosina de cadeia pesada de músculo liso, calponina, caldesmona, esmotelina, SM22- α e α -actina de músculo liso-principal proteína do citoesqueleto em CMLVs diferenciadas), canais iônicos e moléculas sinalizadoras, para exercerem sua função contrátil (OWENS et al., 1995). Do ponto de vista morfológico, as CMLVs, em seu fenótipo contrátil, são fusiformes,

alongadas e estão dispostas obliqua ou diagonalmente umas com as outras. Neste estado, essas células possuem numerosos feixes de miofilamentos e poucas organelas citoplasmáticas (PERROTA, 2013). De outra parte, existem evidências de que células-tronco circulantes, derivadas da medula óssea, originam as células de músculo liso, em condições de injúrias vasculares, transplante de tecidos ou órgãos e inflamação (OWENS et al., 2004).

Em resposta a injúrias vasculares, as CMLVs sofrem um processo de desdiferenciação e passam a exibir um fenótipo sintético, caracterizado por mudanças fenotípicas bruscas e reversíveis, como o aumento das taxas de proliferação, de migração e de síntese de componentes da matriz extracelular e redução da expressão de proteínas marcadoras do estado contrátil, principalmente a α -actina (OWENS et al., 2004; SOBUE et al., 1999). Neste estado, as CMLVs apresentam poucos filamentos e um grande número de organelas citoplasmáticas, como retículo endoplasmático, complexo de golgi e ribossomos livres, características estas relacionadas à capacidade de síntese de matriz extracelular (MELTZ et al., 2012). Ainda, em processos fisiopatológicos, as CMLVs, em estado sintético, passam a produzir mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que podem causar o acúmulo de monócitos, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e matriz extracelular, na parede do vaso. Em adição, quimiocinas como a IL-8, MCP-1 e fractalcina (na forma solúvel) e fatores de crescimento como o PDGF (*platelet derived growth factor*) e o FGF (*fibroblast growth factor*) também são produzidos pelas CMLVs e atuam como agentes quimiotáticos e ativadores de leucócitos. De modo similar às células endoteliais, as CMLVs expressam as moléculas de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (PRINTSEVA et al., 1992; DAVIES et al., 1993) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) (OBRIEN et al., 1993; BOBRY SHEV et al., 1996), responsáveis pela interação dessas células com leucócitos, especialmente os monócitos. Outras moléculas de adesão, como as integrinas $\alpha\beta_3$ e $\alpha\beta_5$ são expressas neste estado, favorecendo a migração das CMLVs (STRINGA et al., 2000). NEWBY (2006) correlacionou a participação das MMPs à mudança de fenótipo das CMLVs, do estado contrátil para o sintético, pela capacidade destas enzimas degradarem componentes da matriz extracelular e favorecerem a migração das células e a síntese de novos componentes da matriz extracelular. Neste sentido, a literatura apresenta evidências de que as CMLVs interagem com a matriz extracelular recém-formada e desencadeiam uma cascata

de sinalização que envolve as integrinas e acarreta a reorganização de proteínas do citoesqueleto, com consequente mudança de fenótipo e migração persistente das CMLVs. (BELO et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, durante processos patológicos, como a aterosclerose, as CMLVs migram da camada média para a camada íntima dos vasos, onde proliferam, depositam componentes da matriz extracelular, convertem estrias gordurosas em placa ateromatosa, contribuindo para o aumento da lesão aterosclerótica (RUDJANTO, 2007). A migração e a proliferação das CMLVs são processos regulados pelas MMPs e por fatores de crescimento, em especial o PDGF e o FGF, liberados pelas mesmas e por outras células. Além destes, a endotelina-1, trombina, NO (óxido nítrico), TGF (*transforming growth factor*) e as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α regulam estes fenômenos (LIBBY et al., 1995; LOPPNOW e LIBBY, 1992; WANG et al., 2005; LIBBY et al., 1988; KIM et al., 2010; WANG et al., 2011; JOVINGE et al., 1997). A produção dos agentes citados pode ser induzida por diferentes estímulos injuriosos. No entanto, não há estudos relacionados ao papel das metaloproteinasas na geração desses mediadores inflamatórios, pelas CMLVs

Quanto aos prostanoídes, é conhecido que sua produção se inicia a partir da ação de fosfolipases A_2 (FLA $_2$) em fosfolípidos de membrana, liberando o ácido araquidônico. Este ácido é metabolizado pelas enzimas ciclooxygenases -1 e -2 (COX-1 e COX-2), gerando, a PGH $_2$, que é convertida por sintases terminais, gerando os prostanoídes (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). As FLA $_2$ podem ser classificadas em três grupos, de acordo com a sua localização e requerimento de cálcio para sua atividade enzimática: fosfolipases A_2 secretadas (sFLA $_2$), citosólica (cFLA $_2$) e independente de cálcio (iFLA $_2$) (DENNIS, 1994). Essas enzimas são expressas constitutivamente e podem ser induzidas, em condições fisiopatológicas, de modo que a sFLA $_2$ do grupo IIA é considerada a isoforma mais abundante de FLA $_2$ em CMLVs (NAKANO et al., 1990, BEASLEY, 1999). Em relação às COXs, a COX-1 é a isoforma expressa de modo constitutivo, na maioria das células e é responsável pela formação de prostanoídes, em condições fisiológicas. Nestas condições, a TXA $_2$ (tromboxana A_2) e a PGI $_2$ (prostaciclina) são os principais responsáveis pelo controle da homeostasia do sistema cardiovascular (BUNTING et al., 1983; DAVIDGE, 2001; CHENG et al., 2002). A COX-2, por sua vez, pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida sob diversas condições fisiopatológicas, de natureza inflamatória (KATORI e MAJIMA, 2000). Neste sentido, a expressão

dessa isoforma foi detectada em CMLVs estimuladas por diferentes agentes inflamatórios e mitogênicos (BEASLEY, 1999; RIMARACHIN et al., 1994). Os prostanoídes podem desencadear seus efeitos a partir da ativação de diferentes tipos de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são classificados em 5 tipos, denominados, de acordo com seus ligantes, como: DP para PGD₂, EP para PGE₂, FP para PGF₂, IP para PGI₂ e TP para TXA₂. Os receptores IP e TP (PFISTER et al., 1997) são expressos em CMLVs, sendo o IP o receptor mais abundante nestas células, em congruência com a importância da ação da PGI₂ no sistema cardiovascular (SMYTH e FITZGERALD, 2002). Em relação aos receptores da PGE₂, foi detectada a expressão dos subtipos EP1, EP2, EP3 e EP4 em CMLVs (PAUL et al., 1998, YAU e ZAHRAKKA, 2003), sendo o receptor EP2 o subtipo predominante nestas células (PAUL et al., 1998).

Em condições fisiopatológicas, como a aterosclerose, os prostanoídes participam da patogênese da doença, mediando uma variedade de processos, como a agregação plaquetária, vasodilatação e vasoconstrição, inflamação local e adesão leucócito-endotélio (VILA, 2004; KOBAYASHI et al., 2004). Dentre os eicosanóides, a PGI₂ é o principal produto liberado em células de músculo liso vascular e muitos estudos revelam a importância deste mediador na inibição da migração e proliferação destas células (UEHARA et al., 1988; 1991; ISHIMITSU et al., 1990; MORISAKI et al., 1988; FETALVERO et al., 2007; McKEAN et al., 2015;). No que se refere à TXA₂, estudos demonstraram a influência deste mediador na indução da proliferação das CMLVs (UEHARA et al., 1988; NAGANO et al., 2000, CHENG et al., 2002). Por outro lado, há relatos de uma ação ambivalente da PGE₂ na modulação da migração e proliferação das CMLVs. Em CMLVs quiescentes, foi demonstrado que este mediador atua como um agente mitogênico, através da ativação do receptor EP2, porém, em CMLVs ativadas, apresenta atividade anti-proliferativa (WANG et al., 2011; YAU e ZAHKADARA, 2003). Estes relatos sugerem que os efeitos da PGE₂ em CMLVs dependem do estágio de crescimento celular e do subtipo predominante de receptor. Da mesma maneira, foi demonstrado que a PGE₂ participa da migração das CMLVs através da ativação dos seus quatro subtipos de receptores (LIN et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Por outro lado, há estudos que demonstraram a capacidade da PGE₂ em inibir a migração dessas células (GONCHAROVA et al., 2003; BULIN et al., 2005). Além disso, a PGE₂ amplifica o efeito de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , na mudança fenotípica das

CMLVs através da ativação do receptor EP3 (CLÈMENT et al., 2005). Ainda, foi sugerido um possível papel da PGE₂ na modulação fenotípica das CMLVs através da ativação do receptor do subtipo EP4 (BLIRANDO et al., 2015). Neste cenário, verifica-se que são necessárias investigações adicionais, que possam elucidar o papel efetivo da PGE₂ na mudança de fenótipo das CMLVs. –Além disso, não se sabe se existe alguma correlação entre as MMPs e a geração de prostanoídes em CMLVs.

Em suma, as informações acima evidenciam a importância das CMLVs na resposta inflamatória vascular. Dada a capacidade dessas células expressarem MMPs, durante a aterosclerose, os estudos que busquem esclarecer o papel destas enzimas no desenvolvimento da resposta inflamatória em CMLVs e sua relação com o processo migratório das mesmas são relevantes. Dessa forma, a BaP1, metaloproteinase isolada do veneno da serpente *B. asper*, por induzir reação inflamatória em modelos experimentais *in vivo* e ativar funções inflamatórias em leucócitos *in vitro*, representa uma ferramenta científica importante para o estudo de MMPs em processos inflamatórios. O entendimento das ações dessa classe de enzimas em processos intracelulares, que regulam a funcionalidade das CMLVs, tem o potencial de evidenciar novos alvos terapêuticos e favorecer estratégias terapêuticas mais eficientes para o confronto da resposta inflamatória vascular.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os efeitos da metaloproteinase BaP1 em células do músculo liso vascular de ratos, em cultura, com ênfase na ativação do processo de migração e da resposta inflamatória e a inter-relação destes processos.

3.2 Específicos

A partir de ensaios *in vitro*, serão avaliados os efeitos da BaP1, em CMLVs de aorta de rato, em cultura, quanto à:

- ✓ Migração dessas células, do ponto de vista de relação concentração-efeito e perfil temporal;
- ✓ Proliferação celular;
- ✓ Expressão proteica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1;
- ✓ Liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e das quimiocinas MCP-1 e fractalcina;
- ✓ Liberação dos eicosanoides PGE₂, PGI₂, TXA₂ e LTB₄;
- ✓ Indução da mudança fenotípica das CMLVs.
- ✓ Expressão proteica de COX-1, COX-2, PGESm-1 e dos receptores de PGE₂ - EP1, EP2, EP3 e EP4- e gênica das FLA₂ secretadas e intracelulares;
- ✓ Participação de COX-1 e -2, das sFLA₂ do grupo II A e intracelulares do grupo IV e VIA (cFLA₂ e iFLA₂) na liberação de PGE₂;
- ✓ Regulação da liberação de PGE₂, pelos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4;
- ✓ Participação da COX-2, das sFLA₂ e intracelulares, dos receptores de PGE₂ (EP1-EP4), do LTB₄ e das citocinas IL-1 β na migração das CMLVs induzida pela metaloproteinase;
- ✓ Indução da mudança fenotípica das CMLVs;
- ✓ Participação da COX-2 e do LTB₄ na mudança de fenótipo das CMLVs.

7. CONCLUSÕES

I – A BaP1 induziu, em células musculares lisas de ratos:

- a migração celular;
- a liberação das citocinas MCP-1, fractalcina e IL- β ;
- a liberação dos mediadores lipídicos PGE₂ e LTB₄, mas não de PGI₂ e TXA₂;
- a expressão proteica de COX-2 e PGESm-1, mas não de COX-1;
- a expressão gênica das FLA₂ dos grupos IIA e IVA, mas não do grupo VIA;
- a mudança de fenótipo.

II – Em CMLVs de ratos estimuladas pela BaP1:

- a liberação de PGE₂ é dependente de COX-1, -2 e das FLA₂ intracelulares;
- a migração celular é dependente de LTB₄, de IL-1 β e da PGE₂, via ativação do receptor EP3, mas não dos demais subtipos de receptores EPs e nem das COXs.

8 REFERÊNCIAS

ABBASZADE, I.; LIU, R. Q.; YANG, F.; ROSENFELD, S. A.; ROSS, O. H.; LINK, J. R.; ELLIS, D. M.; TORTORELLA, M. D.; PRATTA, M. A.; HOLLIS, J. M.; WYNN, R.; DUKE, J. L.; GEORGE, H. J.; HILLMAN, M. C.; MURPHY, K.; WISWALL, B. H.; COPELAND, R.A.; ANGEL, J.; BERENBAUM, F.; LE DECICCO, C. P. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage.. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n. 33, p.23443-23450, 1999.

ADEDOYIN, O.O.; LOFTIN, C.D. Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Expression by Aortic Smooth Muscle Cells Attenuates the Differentiated Phenotype. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.68, n.2, p.127-42. 2016.

ALEXANDER, M.R.; OWENS, G.K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. **Annual Review of Physiology**, v.74, p.13-40, 2012.

ALI, K.; LUND-KATZ, S.; LAWSON, J.; PHILLIPS, M.C.; RADER, D.J. Structure-function properties of the apoe-dependent cox-2 pathway in vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.196, n.1, p.201-9, 2008.

AIKAWA, M.; RABKIN, E.; OKADA, Y.; VOGLIC, S.J.; CLINTON, S. K., BRINCKERHOFF, C. E.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. **Circulation**, v.97, p.2433-2444, 1998.

ANDREANI, M., OLIVIER, J.-L., BERENBAUM, F., RAYMONDJEAN, M., BÉRÉZIAT, G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.149-158, 2000.

BAYSTON, T.; RAMESSUR, S.; REISE, J.; JONES, K.G.; POWELL, J.T. Prostaglandin e2 receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells. **Journal of Vascular Surgery**, v.38, n.2, p.354-9, 2003

BARLIC, J.; ZHANG, Y.; MURPHY, P.M. Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.19167–19176, 2007

BEASLEY, D. COX-2 and cytosolic PLA2 mediate IL-1beta-induced cAMP production in human vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v.276, n. 4 Pt 2, p.H1369-78, 1999.

BEAUDEUX, J.L.; GIRAL, P.; BRUCKERT, E.; FOGLIETTI, M.J.; CHAPMAN, M.J. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives.. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.42, n.2, p.121-31, 2004.

BELO, V.A.; GUIMARÃES, D.A.; CASTRO, M.M. Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular

remodeling in hypertension.. **Journal of Vascular Research**, v.52, n.4, p.221-31, 2015.

BENDECK, M. P.; ZEMPO, N.; CLOWES, A. W.; GALARDY, R. E.; REIDY, M. A. . **Circulation Research**, v.75, p.539-545, 1994.

BJARNARSON, J.; FOX, J. W. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. **Methods in Enzymology**, v.248, p.345-368, 1995.

BLACK, R.A; RAUCH, C. T; KOZLOSKY, C. J; PESCHON, J. J; SLACK, J. L; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R.J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v.385, n.6618, p.729-733, 1997.

BLIRANDO, K.; BLAISE, R.; GORODNAYA, N.; ROUXEL, C.; MEILHAC, O.; VINCENT, P.; LIMON, I. The stellate vascular smooth muscle cell phenotype is induced by IL-1 β via the secretion of PGE2 and subsequent cAMP-dependent protein kinase A activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1853, n.12, p.3235-47, 2015

BOBRY SHEV, Y.V.; LORD, R.S.A.; RAINER, S.P.; MUNRO, V.F. VCAM-1 expression and network of VCAM-1 positive vascular dendritic cells in advanced atherosclerotic lesions of carotid arteries and aortas. **Acta histochemica**, v.98, p.185–194, 1996.

BONAZZI, A.; BOLLA, M.; BUCCELLATI, C.; HERNANDEZ, A.; ZARINI, S.; VIGANO, T.; FUMAGALLI, F.; VIAPPIANI, S.; RAVASI, S.; ZANNINI, P.; CHIESA, G.; FOLCO, G.; SALA, A. Effect of endogenous and exogenous prostaglandin E(2) on interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression in human airway smooth-muscle cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.62, p.2272–2277, 2000.

BRADBURY, D.A.; NEWTON, R.; ZHU, Y.M.; EL-HAROON, H; CORBETT, L.; KNOX, A.J. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E2, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.50, p.49954-64, 2003.

BREYER, R.M.; BAGDASSARIAN, C.K.; MYERS, S.A.; BREYER, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling.. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.41, p.661-90, 2001.

BRIONES, A.M.; ARRIBAS, S.M.; SALAICES, M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.19, p.187–194, 2010.

BULIN, C; ALBRECHT, U.; BODE, J.G.; WEBER, A.A.; SCHRÖR, K.; LEVKAU, B.; FISCHER, J.W. Differential effects of vasodilatory prostaglandins on focal adhesions, cytoskeletal architecture, and migration in human aortic smooth muscle cells.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v.25, n.1, p.84-9, 2005.

BUNTING, S.; MONCADA, S.; VANE, JR. The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications.. **British Medical Bulletin**, v.39, n.3, p.271–6, 1983.

CAI, Q.; LANTING, L.; NATARAJAN R. Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.287, p.C707–C714, 2004

CALVETE, J.J., JUAREZ, P., SANZ, L. Snake venomomics. strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v.42, n.11, p.1405–1414, 2007.

CAMACHO, M.; GERBOLÉS, E.; ESCUDERO, J.R.; ANTÓN, R.; GARCÍA-MOLL, X.; VILA, L. Microsomal prostaglandin e synthase-1, which is not coupled to a particular cyclooxygenase isoenzyme, is essential for prostaglandin e(2) biosynthesis in vascular smooth muscle cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.5, n.7, p.1411-9, 2007.

CANAULT, M.; LEROYER, A.S.; PEIRETTI, F.; LESECHE, G.; TEDGUI, A.; BONARDO, B.; ALESSI, M.C.; BOULANGER, C.M.; NALBONE, G. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1.. **Am. J. Pathol.**, **171**, 1713–1723, 2007.

CANAULT, M.; PEIRETTI, F.; KOPP, F.; BONARDO, B.; BONZI, M-F.; COUDEYRE, J-C.; ALESSI, M-C.; JUHAN-VAGUE, I.; NALBONE, G. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. **The American Journal of Pathology**, v.187, p.82–91, 2006.

CASTRO, J.M.; OLIVEIRA, T.S.; SILVEIRA, C.R.; CAPORRINO, M.C.; RODRIGUEZ, D.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; RAMOS, O.H.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; MAGALHÃES, G.S.; FAQUIM-MAURO, E.L.; FERNANDES, I. A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A P-I hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops asper snake venom. **Toxicon**. v.87, p.81-91, 2014.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAÍ, H.; LAMAR, K. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **National Academy of Sciences**, v.99, n.21, p.13926-13931, 2002.

CHEN, Q.; JIN, M.; YANG, F.; ZHU, J.; XIAO, Q.; ZHANG, L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation

and remodeling. **Mediators of Inflammation**, v.2013, 2013.

CHENG, Y.; WANG, M.; YU, Y.; LAWSON, J.; FUNK, C.D.; FITZGERALD, G.A. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin synthase-1, and cardiovascular function. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.1391–9, 2006.

CHENG, Y.; AUSTIN, S.C.; ROCCA, B.; KOLLER, B.H.; COFFMAN, T.M.; GROSSER, T.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. **Science**, v.296, n.5567, p.539–41, 2002.

CHO, A.; REIDY, M. A. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury.. **Circulation Research**, v.91, p.845-851, 2002.

CHOI, H.C.; KIM, H.S.; LEE, K.Y.; CHANG, K.C.; KANG, Y.J. NS-398, a selective COX-2 inhibitor, inhibits proliferation of IL-1 β -stimulated vascular smooth muscle cells by induction of HO-1. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.376, p.753–757, 2008.

CLÉMENT, N.; GLORIAN, M.; RAYMONDJEAN, M.; ANDRÉANI, M.; LIMON, I. PGE₂ amplifies the effects of il-1 β on vascular smooth muscle cell differentiation: a consequence of the versatility of pge2 receptors 3 due to the emerging expression of adenylyl cyclase 8. **Journal of Cellular Physiology**, v.208, n.3, p.495-505, 2006

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v.39, n.10, p.1567-1573, 2001.

COLEMAN, R.A., SMITH, W. L., NARUMIYA, S. VIII. International Union of Pharmacology Classification of Prostanoids Receptors: Properties, Distribution, and Structure of the Receptors and Their Subtypes. **Pharmacological reviews**, v.46, n.2, p.206-24, 1994.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation.. **Inflammation**, v.26, n.1, p.13-17, 2002.

CSISZAR, A.; SOSNOWSKA, D.; WANG, M.; LAKATTA, E.G.; SONNTAG, W.E.; UNGVARI, Z. Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate Macaca mulatta: reversal by resveratrol treatment. **The journals of gerontology**, v.67, n.8, p.811-20, 2012.

DAHLER, G. S.; BARRAS, F.; KEEN, N. T. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from Erwinia chrysanthemi EC16. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.10, p.5803-5815, 1990.

DAUTOVA, Y.; KAPUSTIN, AN.; PAPPERT, K.; EPPLE, M.; OKKENHAUG, H.;

COOK, S.J.; SHANAHAN, C.M.; BOOTMAN, M.D.; PROUDFOOT, D. Calcium phosphate particles stimulate interleukin-1 β release from human vascular smooth muscle cells: A role for spleen tyrosine kinase and exosome release. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.115, p.82-93, 2018.

DAVIES, M.J.; GORDON, J.L.; GEARING, A.J.H; PIGOTT, R.; WOOLF, N.; KATZ, D.; KYRIAKOPOULOS, A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.. **The Journal of Pathology**, v.171, p.223–229, 1993.

DAVIDGE, S.T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation Research**, v.89, n.8, p.650–60, 2001.

DE CATERINA, R.; MAZZONE, A.; GIANNESI, D.; SICARI, R.; PELOSI, W.; LAZZERINI, G.; AZZARA', A.; FORDER, R.; CAREY, F.; CARUSO, D.; et al. Leukotriene B4 production in human atherosclerotic plaques. **Biomedica biochimica acta**, v.47, n.10-11, p.S182-5, 1988.

DE KEIJZER, S.; MEDDENS, M.B.; TORENSMA, R.; CAMBI, A.The Multiple Faces of Prostaglandin E2 G-Protein Coupled Receptor Signaling during the Dendritic Cell Life Cycle **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.6542-6555, 2013.

DELCLAUX, C.; DELACOURT, C.; D'ORTHO, M. P.; BOYER, V.; LAFUMA, C.; HARF, A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.14, n.3, p.288-295, 1996.

DENNIS E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2.J **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.18, p.13057-60, 1994

DENNIS, E.A; DEEMS, R.A; YU, L. Extracellular phospholipase A2. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.318, p.35–39, 1992.

DREYMUELLER, D.; PRUESSMEYER, J.; GROTH, E.; LUDWIG, A. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. **European Journal of Cell Biology**, v.91, p.472– 485, 2012.

DWIVEDI, A.; SLATER, S. C.; GEORGE, S.J. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation..**Cardiovascular Research**, v.81, p.178–186, 2009.

ESCALANTE, T.;RUCAVADO, A.;KAMIGUTI, A.S.;THEAKSTON,R.D.G.; GUTIÉRREZ, J.M. Bothrops asper metalloproteinase BaP1 is inhibited by alpha(2)-macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy.**Toxicon**, v.43, n.2, p.213-217, 2004.

EUN SY, KO YS, PARK SW, CHANG KC, KIM HJ. IL-1 β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release. **Vascular Pharmacology**, v.72, p.108-17, 2015.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase bap-1 activate the complement system. role in leucocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v.9, n.5, p.213-21,2000.

FAVEEUW, C.; PREECE, G.; AUGER, A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. **Blood**, v.98, n.3, p.688-695, 2001.

FERNANDES, C. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; LEITE, A. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROCHA, F. A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE2-dependent mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v.151, n.8, p.1254 - 1261, 2007.

FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v.47, n.5, p.549-559, 2006.

FETALVERO, K.M.; MARTIN, K.A.; HWA, J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.82, p.109 – 118, 2007.

FLORIO, C.; MARTIN, J.G.; STYHLER, A.; HEISLER, S. Antiproliferative effect of prostaglandin E2 in cultured guinea pig tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v.266, p.L131-7, 1994.

FURUKAWA Y, MATSUMORI A, OHASHI N, SHIOI T, ONO K, HARADA A, MATSUSHIMA K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. **Circulation Research**, v.19, n.3, p.306-14, 1999

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v.275, n.12, p.3016-3030, 2008.

FRASER, A.; FEARON; U.; REECE, R.; EMERY, P.; VEALE, J. Matrix metalloproteinase 9, apoptosis, and vascular morphology in early arthritis.. **Arthritis & Rheumatism**, v.44, n.9, p.2024 – 2028, 2001.

FRID, M.G.; SHEKHONIN, B.V.; KOTELIANSKY, V.E.; GLUKHOVA, M.A. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. **Developmental Biology**, v.153, p.185–193, 1992.

GALIS, Z.S.; SUKEOVA, G.K.; LIBBY, P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue.. **The FASEB Journal**, v.9, p.974-980, 1995

GARTON, K.J.; GOUGH, P.J.; BLOBEL, C.P.; MURPHY, G.; GREAVES, D.R.; DEMPSEY, P.J.; RAINES, E.W. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.37993–38001, 2001.

GEARING, A. J. H.; BECKETT, P.; CHRISTODOULOU, M.; CHURCHILL, M.; CLEMENTS, J.; DAVIDSON, A. H.; DRUMMOND, A. H.; GALLOWAY, W. A.; GILBERT, R.; GORDON, J. L.; LEBER, T. M.; MANGAN, M.; MILLER, K.; NAYEE, P.; OWEN, K.; PATEL, S.; THOMAS, W.; WELLS, G.; WOODLEY, K. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. **Nature**, v.370, n.6490, p.555-557, 1994.

GALIS, Z. S.; SUKHOVA, G. K.; LARK, M. W.; LIBBY, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **Journal of Clinical Investigation**, v.94, p.2493-2503, 1994.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **The Journal Cell**, v.104, p.503–516, 2001.

GOETZE, S.; XI, X.P.; KAWANO, Y.; KAWANO, H.; FLECK, E.; HSUEH, W.A.; LAW, R.E. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. **Hypertension**, v.33, p.183-9, 1999.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ A; SÁNCHEZ-GALÁN E; MARTÍN-VENTURA JL; VIDAL C, BLANCO-COLIO LM; ORTEGO M; VEGA M, SERRANO J, ORTEGA L, HERNÁNDEZ G, TUNÓN J, EGIDO J. Atorvastatin reduces the expression of prostaglandin E2 receptors in human carotid atherosclerotic plaques and monocytic cells: potential implications for plaque stabilization. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.47, n.1, p.60-9, 2006.

GONCHAROVA, E.A.; BILLINGTON, C.K.; IRANI, C.; VOROTNIKOV, A.V.; TKACHUK, V.A.; PENN, R.B.; KRYMSKAYA, V.P.; PANETTIERI, R.A. JR. Cyclic amp-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration American. **Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.19-27, 2003

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake Bothrops asper (terciopelo). **Toxicon**, v.33, n.1, p.19-29, 1995.

GUO Y, LI B, XU X, WU R, LI W. sPLA2-IIA Augments Oxidized LDL-Induced MCP-1 Expression in Vitro Through Activation of Akt. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.37, n.4, p.1345-54, 2015.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature Immunology**, v.12, n.3, p.204-12. Review, 2011.

HELLER, E.A.; LIU, E.; TAGER, A.M.; SINHA, S.; ROBERTS, J.D.; KOEHN, S.L.; LIBBY, P.; AIKAWA, E.R.; CHEN, J.Q.; HUANG, P.; FREEMAN, M.W.; MOORE,

K.J.; LUSTER, A.D.; GERSZTEN, R.E. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB₄ and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. **Circulation**, v.112, n.4, p.578-86, 2005.

HERRERA C.; VOISIN M.B.; ESCALANTE T.; RUCAVADO, A.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of PI and PIII Snake Venom Haemorrhagic Metalloproteinases on the Microvasculature: A Confocal Microscopy Study on the Mouse Cremaster Muscle. **PLoS One**, v.11, n.12, p.e0168643, 2016.

HERRERA, C.; ESCALANTE, T.; VOISIN, M.B.; RUCAVADO, A.; MORAZÁN, D.; MACÊDO, J.K.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.4, 2015.

HERNÁNDEZ, R.; CABALCETA, C.; SARAIVA-OTTEN, P.; CHAVES, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by bothrops asper venom: alterations in microvasculature and nerves. **PLoS One**, v.6, n.5, p.19834, 2011.

HITE, L. A.; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v.373, n.7, p.381-385, 1992.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v.354, n.1, p.1-6, 1994.

HORRILLO, R.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; MARTÍNEZ-CLEMENTE, M.; LÓPEZ-PARRA, M.; FERRÉ, N.; TITOS, E.; MORÁN-SALVADOR, E.; DEULOFEU, R.; ARROYO, V.; CLÀRIA, J. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. **Journal of Immunology**, v.184, n.7, p.3978-87, 2010.

HOWARD, L.; LU, X.; MITCHELL, S.; GRIFFITHS, S. GLYNN, P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types.. **Biochemical Journal**, v.317, n.21, p.45-50, 1996.

HOWARD G.; O'LEARY D.H.; ZACCARO D, HAFFNER S.; REWERS M.; HAMMAN R.; SELBY J.V.; SAAD M.F.; SAVAGE P.; BERGMAN R. Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. **Circulation**, v.93, p.1809–17, 1996.

HU, G.; QIAO, Q; TUOMILEHTO, J.; BALKAU, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; PYORALA, K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. **Archives of Internal Medicine**, v.164, p.1066–76.2004.

HUNDHAUSEN, C.; SCHULTE, A.; SCHULZ, B.; ANDRZEJEWSKI, M.G.; SCHWARZ, N.; VON HUNDELSHAUSEN, P.; WINTER, U.; PALIGA, K.; REISS, K.; SAFTIG, P.; WEBER, C.; LUDWIG, A. Regulated shedding of transmembrane

chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. **The Journal of Immunology**, v.178, p.8064–8072, 2007

HUNGERFORD, J.E.; LITTLE, C.D. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. **Journal of Vascular Research**, v.36, p.2–27, 1999.

HUNGERFORD, J.E.; OWENS, G.K.; ARGRAVES, W.S.; LITTLE, C.D. Identification of a novel marker for primordial smooth muscle and its differential expression pattern in contractile vs noncontractile cells. **Developmental Biology**, v.178, p.375–392, 1996.

HURT-CAMEJO, E.; CAMEJO, G.; PEILOT, H.; OÖRNI, K.; KOVANEN, P. Phospholipase A2 in Vascular Disease. **Circulation Research**, v.89, p.298–304, 2001.

HURT-CAMEJO, E., ANDERSEN, S., STANDAL, R., ROSENGREN, B., SARTIPY, P., STADBERG, E., JOHANSEN, B. Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, p.300-309, 1997.

ISHIMITSU, T.; UEHARA, Y.; ISHII, M.; MATSUOKA, H.; IKEDA, T.; SUGIMOTO, T. Roles of endogenous vasodepressor prostaglandins in growth of vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v.54, p.1546-1553, 1990.

IVANDIC, B.; CASTELLANI, L.W.; WANG, X-P; QIAO, J-H.; MEHRABIAN, M.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; GRASS, D.S.; SWANSON, M.E.; DE BEER, M.C.; DE BEER, F.; LUSIS, A.J. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis. 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; **19**: 1284–1290, 1999.

JAULMES, A.; JANVIER, B.; ANDREANI, M.; RAYMONDJEAN, M. Autocrine and paracrine transcriptional regulation of type IIA secretory phospholipase A2 gene in vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.5, n.6, p.1161-7, 2005.

JIA, L.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v.34. n.11-12, p.1269- 1276, 1996.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, n.10, 2008.

JOVINGE, S.; HULTGARDH-NILSSON, A.; REGNSTRÖM, J.; NILSSON, J. Tumor necrosis factor- α activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, p.490–497, 1997.

J.L. JOHNSON. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v.5, n.2, p.265-282, 2007.

JOHNSON, C.; GALIS, Z.S. Tumor necrosis factor- α activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, n.1, p.54-60, 2004

KATORI, M.; MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. **Inflammation Research**, v.49, n.8, p.367-92, 2000.

KIM, H.; LEE, M.-J.; KIM, J.-E.; PARK, S.-D.; MOON, H.-I.; PARK, W.-H. Genistein suppresses tumor necrosis factor- α -induced proliferation via the apoptotic signaling pathway in human aortic smooth muscle cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.2015–2019, 2010.

KOBAYASHI, T.; TAHARA, Y.; MATSUMOTO, M.; IGUCHI, M.; SANO, H.; MURAYAMA, T.; ARAI, H.; OIDA, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; YAMASHITA, J.K.; KATAGIRI, H.; MAJIMA, M.; YOKODE, M.; KITA, T.; NARUMIYA, S. Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.6, p.784–94, 2004.

KUDO, I, MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, n.68–69, p.3–58, 2002

KRATZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C. P.. J. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.9, p.4593-4596, 1996.

KULMACZ, R.J.; WANG, L.H. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.41, p.24019-23, 1995.

LACOLLEY, P.; REGNAULT, V.; NICOLETTI, A., LI, Z.; MICHEL, J.B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. **Cardiovascular Research**, v.95, p.194–204, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, M.Y.; GARVEY, S.M.; BARAS, A.S.; LEMMON, J.A.; GOMEZ, M.F.; SCHOPPEE BORTZ, P.D.; DAUM, G.; LEBOEUF, R.C.; WAMHOFF, B.R.. Integrative genomics identifies DSCR1 (RCAN1) as a novel NFAT-dependent

mediator of phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells. **Human Molecular Genetics**, v.19, p.468–479, 2010

LEI , Z.Z.; DENG, Y.P. The effect of prostaglandin E2 (PGE2) on growth, proliferation, morphology and protein synthesis of aortic smooth muscle cells (SMC) in vitro. **Chung Hua Ping Li HsuehTsaChih**, v.18, p.188-190, 1989.

LEMARIE, C.A.; THARAUX, P.L.; LEHOUX, S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.48, p.433–439, 2009.

LI, S.; CHENG, L.; AN, D.; SONG, S.; LIANG, H.; CHU, F.; JI, A. J Whitmania Pigra Whitman Extracts Inhibit Lipopolysaccharide Induced Rat Vascular Smooth Muscle Cells Migration and their Adhesion Ability to THP-1 and RAW 264.7 Cells. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.24, n.3, p.301-311, 2017.

LIBBY,P.; OKAMOTO,Y.; ROCHA,V.Z.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice.. **Circulation Journal**, v.74, n.2, 213-20, 2010.

LIBBY, P.; SUKHOVA, G.; LEE, R.T.; GALIS, Z.S. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque.. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.25, p.S9-S12, 1995.

LIBBY,P.; WAMER, S.J.C.; FRIEDMAN G.B. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. **Journal of Clinical Investigation**, v.81, p.487-498, 1988.

LIN CC, LIN WN, CHENG SE, TUNG WH, WANG HH, YANG CM. Transactivation of EGFR/PI3K/Akt involved in ATP-induced inflammatory protein expression and cell motility. **Journal of Cellular Physiology**, v.227, n.4, p.1628-38, 2012.

LIN, C.C.; LIN, W.N.; WANG, W.-J.; SUN, C.-C.; TUNG, W.-H.; WANG, H.-H.; YANG, C.-M. Functional coupling expression of COX-2 and cPLA2 induced by ATP in rat vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, p38 MAPK, and NF-kappaB. **Cardiovascular Research**, v.82, p.522–531, 2009.

LIU, HQ; ZHANG, XY; EDFELDT, K; NIJHUIS, MO; IDBORG, H; BÄCK M; ROY J; HEDIN U; JAKOBSSON PJ; LAMAN JD; DE KLEIJN DP, PASTERKAMP G, HANSSON GK, YAN ZQ. NOD2-mediated innate immune signaling regulates the eicosanoids in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**; v.33, n.9, p.2193-201, 2013.

LIU, W.; JIANG, L.; BIAN, C.; LIANG, Y.; XING, R.; YISHAKEA, M.; DONG, J. Role of CX3CL1 in Diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.64, n.5, p.371-83, 2016.

LUCAS, A.D.; CHADWICK, N.; WARREN, B.F.; et al. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. **The American Journal of Pathology**, v.158, n.3, p.855-866, 2001

LOPPNOW, H.; LIBBY, P. Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin 1 in paracrine and autocrine regulation pathways. **Experimental Cell Research**, v.198, p.283–290, 1992.

LU, X.; YIN, D.; ZHOU, B.; LI, T. MiR-135a Promotes Inflammatory Responses of Vascular Smooth Muscle Cells From db/db Mice via Downregulation of FOXO1. **International Heart Journal**, v.59, n.1, p.170-179, 2018.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; ESCUDERO, I.; BADIMON, L. Simvastatin potentiates pgi(2) release induced by hdl in human vsmc: effect on cox-2 up-regulation and mapk signalling pathways activated by hdl. **Atherosclerosis**, v.174, n.2, p.305-13, 2004.

MASSOVA, I.; KOTRA, L.P.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. **The FASEB Journal**, v.12, n.12, p.1075-95, 1998.

MCKEAN, J.S.; MURRAY, F.; GIBSON, G.; SHEWAN, D.A.; TUCKER, S.J.; NIXON G.F. The cAMP-producing agonist beraprost inhibits human vascular smooth muscle cell migration via exchange protein directly activated by cAMP. **Cardiovasc Research**, v.107, n.4, p.546-55, 2015.

MELTZ, R.P.; PATTERSON, J.L.; WILSON, E. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization. **Methods in Molecular Biology**, v.843, p.169-76, 2012.

MENSCHIKOWSKI M, HAGELGANS A, SIEGERT G. Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? **Prostaglandins & Other Lipid Mediator**, v.79, p.1–33, 2006.

MONTERO-VEGA, M. T. The inflammatory process underlying atherosclerosis. **Critical Reviews™ in Immunology**, v.32, n.5, p.373-462; 2012.

MORAES, J.; ASSREUY, J.; CANETTI, C.; BARJA-FIDALGO, C. Leukotriene b4 mediates vascular smooth muscle cell migration through $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin transactivation. **Atherosclerosis**, v.212, n.2, p.406-13, 2010.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; ZAMUNÉR, S.R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C.D.E. F. Secretory phospholipases a(2) isolated from bothrops asper and from crotalus durissus terrificus snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins e2 and d2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v.52, n.3, p.428-39, 2008.

MORIYA, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. **Journal of Cardiology**, v.pii: S0914-5087, n.18, p.30145-X, 2018.

MORISAKI, N.; KANZAKI, T.; MOTOYAMA, N.; SAITO Y.; YOSHIDA, S. Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin I₂ in cultured rabbit aortic smooth muscle cells.. **Atherosclerosis**, v.71, p.165-177, 1988.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J. I.; DENNISON, J. M. T. J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; TREAKSTON, R. D. G. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, v.26, n.9, p. 2000-2005, 1996.

MULLBERG, J.; SCHOOLTINK, H.; STOYAN, T.; GUNTHER, M.; GRAEVE, L.; BUSE, G.; MACKIEWICZ, A.; HEINRICH, P.C.; ROSE-JOHN, S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. **European Journal of Immunology**, v.23, p.473–480, 1993.

MURAKAMI, M.; KAMBE, T.; SHIMBARA, S.; KUDO, I. Functional coupling between various phospholipase A₂s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.5, p.3103–3115, 1999.

MURAKAMI, M.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; KUWATA, H.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; KUDO, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A₂s are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.23, p. 14411–14423, 1998.

MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, R.; AUSTEN, K. F.; ARM, J. P. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D₂ in mouse bone marrow-derived mast cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.35, p.22269 –22275, 1994.

DÍAZ-MUÑOZ, M.D.; OSMA-GARCÍA, I.C.; FRESNO, M.; IÑIGUEZ, M.A. Involvement of pge2 and the camp signalling pathway in the up-regulation of cox-2 and mpges-1 expression in lps-activated macrophages. **Biochemical Journal**, v.443, n.2, 451-61, 2012.

MURPHY, G.; KNÄUPER, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? **Matrix Biology**, v.15, n.8-9, p.511-518, 1997.

NAGANO, K.; TOBA, K.; AKISHITA, M.; WATANABE, T.; KOZAKI K.; ETO M.; HASHIMOTO, M.; SUDOH, N.; AKO J.; MASAO, Y.; YASUYOSHI O. Prostanoids regulate proliferation of vascular smooth muscle cells induced by arginine vasopressin. **European Journal of Pharmacology**, v.389, p.25–33, 2000.

NAKANO T, OHARA O, TERAOKA H, ARITA H. GROUP II phospholipase A₂ mRNA synthesis is stimulated by two distinct mechanisms in rat vascular smooth muscle cells. **FEBS Letter**.12;261(1):171-4, 1990.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death

of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular Research**, v.69, n.3, p.614-24, 2006.

NEWBY, A. C.; ZALTSMAN, A. B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. **The Journal of Pathology**, v.190, p.300-309, 2000.

OBRIEN, K.D.; ALLEN, M.D.; MCDONALD, T.O.; CHAIT, A; HARLAN, J. M.; FISHBEIN, D. ; MCCARTY J.; FERGUSON, M.; HUDKINS, K.; BENJAMIN, C. D. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.945–951, 1993.

OHNAKA K1, NUMAGUCHI K, YAMAKAWA T, INAGAMI T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin ii in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.35, p.68-75, 2000.

O'SULLIVAN, S.A.; GASPARINI, F.; MIR, A.K.; DEV, K.K.. Fractalkine shedding is mediated by p38 and the ADAM10 protease under pro-inflammatory conditions in human astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, v.13, n.1, p.189, 2016.

OWENS, G.K.; KUMAR, M.S.; WAMHOFF, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiological Reviews**, v.84, p.767-801, 2004.

OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. **Physiological Reviews**, v.75, p.487-517, 1995.

OWNBY, C. L. In:SHIER, W. T.; MEBS, D. (Ed.). **Handbook of Toxinology**. New York: Marcel Dekker, p.602-654, 1990.

PALMBERG, L.; CLAEISSON, H.E.; THYBERG, J. Effects of leukotrienes on phenotypic properties and growth of arterial smooth muscle cells in primary culture. **J Journal of Cell Science**, v.93, p.403-8, 1989.

PAUL, B. Z. S.; ASHBY, B.; SHETH, S. B.. Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells. **British Journal of Haematology**, v.102, p.1204–1211, 1998.

PAVICEVIC, Z, LESLIE, C.C, MALIK, K.U. cPLA2 phosphorylation at S515 and S505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cell. **The Journal of Lipid Research**, v.49, p.724-737, 2008.

PANZER, U.; UGUCCIONI, M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **European Journal of Immunology**, v.34, p.3682– 3689, 2004.

PEREAÑEZ, J.A; PATIÑO, A.C.; REY-SUAREZ, P.; NÚÑEZ, V.; HENAO CASTAÑEDA, I.C.; RUCAVADO; A. Glycolic acid inhibits enzymatic, hemorrhagic and edema-inducing activities of BaP1, a P-I metalloproteinase from *Bothrops asper*

snake venom: insights from docking and molecular modeling. **Toxicon**, v.71, p.41-8, 2013.

PERROTTA, I.. Ultrastructural features of human atherosclerosis. **Ultrastructural Pathology**, v.37, n.1, p.43–51, 2013.

PFISTER, S.L; KOTULOCK, D.A; CAMPBELL, W.B.. Vascular smooth muscle thromboxane A2 receptors mediate arachidonic acid-induced sudden death in rabbits. **Hypertension**, v.29, n.(1 pt 2), p.303–309, 1997.

PIRVULESCU M.M.; GAN, A.M.; STAN, D.; SIMION, V.; CALIN, M.; BUTOI, E.; MANDUTEANU, I. Subendothelial resistin enhances monocyte transmigration in a co-culture of human endothelial and smooth muscle cells by mechanisms involving fractalkine, MCP-1 and activation of TLR4 and Gi/o proteins signaling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.50, p.29-37, 2014.

PORRECA, E.; DI, FEBBO, C.; REALE, M.; BARBACANE, R.; MEZZETTI, A.; CUCCURULLO, F.; CONTI, P. Modulation of rat vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation by cysteinyl leukotriene D4: a role for mediation of interleukin 1. **Atherosclerosis**, v.113, n.1, 11-8, 1995.

PRINTSEVA, O-Y; PECLO, M.M.; GOWN, A.M.. Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. **American Journal of Pathology**, v.140, p.889–896, 1992.

PRITCHARD, K.A. JR.; O'BANION, M.K.; MIANO, J.M.; VLASIC, N.; BHATIA, U.G.; YOUNG, D.A.; STEMERMAN, M.B. Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8504–8509, 1994.

RIMARACHIN, J. A.; JACOBSON, J. A.; SZABO, P.; MACLOUF, J.; CREMINON, C.; WEKSLE, B. B.. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.14, p.1021-1031, 1994.

ROAN, J.N.; TSAI, Y.C.; CHEN, I.W.; CHANG, S.W.; HUANG, C.C.; LAM, C.F. Inhibition of cyclooxygenase-2 modulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells during increased aortic blood flow. **Heart Vessels**, v.27, p.307–315, 2012;

ROSS, R.. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801–809, 1993.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v.11, n.2, p.121-128, 2002.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **International Journal Of Experimental Pathology**, v.79, n.4, p. 245-254, 1998.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Experimental and Molecular Pathology**, v.63, n.3, p.186-199, 1995.

RUDIJANTO, A.. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Medica Indonesiana*, v.39, n.2, p.86-93, 2007.

RZUCIDLO, E.M.; MARTIN, K.A.; POWELL, R.J.. Plaque excision with the Silverhawk catheter: early results in patients with claudication or critical limb ischemia. **Journal of Vascular Surgery**, v.45, p.25A-32A, 2007.

SARAVIA-OTTEN, P.; FRISAN, T.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J.M.. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. **Toxicon**. v.44, n.7, p.749-64, 2004.

SAHIN, U., WESKAMP, G., KELLY, K., ZHOU, H.M., HIGASHIYAMA, S., PESCHON, J., HARTMANN, D., SAFTIG, P., BLOBEL, C.P.. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. **Journal of Cell Biology**, v.164, p.769–779, 2004.

SCHOBER, A.; ZERNECKE, A.; LIEHN, E.A.; VON HUNDELSHAUSEN, P.; KNARREN, S.; KUZIEL, W.A.; WEBER, C. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. **Circulation Research**, v.26, n.11, p.1125-33, 2004.

SEO, K.W.; LEE, S.J.; KIM, C.E.; YUN, M.R.; PARK, H.M.; YUN, J.W.; BAE, S.S.; KIM, C.D. Participation of 5-lipoxygenase-derived LTB(4) in 4-hydroxynonenal-enhanced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 208, n.1, p.56-61, 2009.

SHIMOKAWA, K; SHANNON, J.D; JIA, L.G; FOX, J.W.. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.343, n.1, p. 35-43, 1997.

SHITASHIGE, M.; MORITA, I.; MUROTA, S.. Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1389, n.1, p.57-66, 1998.

SIMA P, VANNUCCI L, VETVICKA V. Atherosclerosis as autoimmune disease. **Annals of Translational Medicine**, v.6, n.7, p.116, 2018

SMYTH, E.M.; FITZGERALD, G.A.. Human prostacyclin receptor. **Vitamins and Hormones**, v.65, p.149–65, 2002

SOBUE K, HAYASHI K, NISHIDA W.. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.190, p.105-18, 1999.

SOLER, M; CAMACHO, M; ESCUDERO, J.R; IÑIGUEZ, M.A; VILA, L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. **Circulation Research**, v.87, n.6, p.504-7, 2000.

SPANBROEK, R; HABENICHT, A.J. The potential role of antileukotriene drugs in atherosclerosis.. **Drug News & Perspectives**, v.16, n.8, p.485-9, 2003

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R.A.. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v.78, p.539–552, 2009.

STOCKER, W.; Ng., M.; AULD, D. S.. Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of *Astacus* protease. **Biochemistry**, v.29, n.45, p. 10418-10425, 1990.

STRINGA, E.; KNÄUPER, V.; MURPHY, G.; GAVRILOVIC, J. Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells. **Journal of Cell Science**, v.113, p. 2055-64.

TAKEDA, S., TAKEYA, H., IWANAGA, S.. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1824, n.1, p.164-76, 2012.

TAUBMAN MB, ROLLINS BJ, POON M, MARMUR J, GREEN RS, BERK BC, NADAL-GINARD B. JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v.70, n.2, p.314-25, 1992.

TERVAERT, J. W. C. . Cardiovascular disease due to accelerated atherosclerosis in systemic vasculitides. **Best Practice & Research: Clinical Rheumatology**, v.1, p.33-44. Review, 2013.

TORTORELLA, M. D.; PRATTA, M. A.; FOX, J. W.; ARNER, E.. The Interglobular Domain of Cartilage Aggrecan Is Cleaved by Hemorrhagic Metalloproteinase HT-d (Atrolysin C) at the Matrix Metalloproteinase and Aggrecanase Sites **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.10, p.5846-5850, 1998.

TAKAKU, M.; WADA, Y.; JINNOUCHI, K.; TAKEYA, M.; TAKAHASHI, K.; USUDA, H.; NAITO, M.; KURIHARA, H.; YAZAKI, Y.; KUMAZAWA, Y.; OKIMOTO, Y.; UMETANI, M.; NOGUCHI, N.; NIKI, E.; HAMAKUBO, T.; KODAMA, T.. An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.19, p.2330-2339, 1999.

TIAN, S.; YUAN, Y.; LI, Z.; GAO, M.; LU, Y.; GAO, H. LncRNA UCA1 sponges miR-26a to regulate the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. **Gene**, v.673, p.159-166, 2018.

TSOU, C.L; HASKELL, C.A; CHARO, I.F. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.48, p.44622-44626, 2001

TURNER, N.A; HALL, K.T; BALL, S.G; PORTER K.E. Selective gene silencing of either MMP-2 or MMP-9 inhibits invasion of human saphenous vein smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.193, n.1, p.36-43, 2007.

UEHARA,Y.; SHIMITSU, T.Z.; KIMURA, K.; ISHI,I M.; IKEDA T.; SUGIMOTO,.T. Regulatory effects of eicosanoids on thymidine uptake by vascular smooth muscle cells of rats.**Prostaglandins**, v.36, p.847-857,1988.

UEHARA,Y.; NUMABE, A.; KAWABATA Y.; NAGATA T.; HIRAWA N.; ISHIMITSU T.; MATSUOKA H., IKEDA T.; SUGIMOTO T.. Rapid smooth muscle cell growth and endogenous prostaglandin system in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v.4, p.806-814, 1991.

UZUI, H; LEE, JD; SHIMIZU, H; TSUTANI, H; UEDA, T. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.149, p.51–59, 2000.

VILA, L.. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. **Medicinal Research Reviews**, v.24, n.4, p.399–424, 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H.. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.**Circulation Research**, v.92 n.8, p.827– 39, 2003.

YANAGI , H.; SASAGURI, Y.; SUGAMA K.; MORIMATSU M.; NAGASE, H.. Production of tissue collagenase (matrix metalloproteinase 1) by human aortic smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor. **Atherosclerosis**, v.91, p.207-216, 1991.

YANG, C; LIU, X; CAO, Q; LIANG, Q; QIU, X. Prostaglandin E receptors as inflammatory therapeutic targets for atherosclerosis. **Life Sciences**, v.88, p.201–205, 2011

YANG, X.; SHEARES, K. K. K.; DAVIE, N.; UPTON, P.D.; TAYLOR, G. W.; HORSLEY, J.; WHARTON, J.; MORRELL, N. W.. Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.27, p.688–696, 2002.

YARLA, N.S.; BISHAYEE, A.; VADLAKONDA, L.; CHINTALA, R.; DUDDUKURI, G.R.; REDDANNA, P.; DOWLURU, K.S. Phospholipase A2 Isoforms as Novel Targets for Prevention and Treatment of Inflammatory and Oncologic Diseases. **Current Drug Targets**, v.17, n.16, p.1940-1962, 2016.

YAU L.; ZAHRADKA, P.. PGE(2) stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.203, p.77-90, 2003.

YU, Z.; RICCIOTTI, E.; MIWA, T.; LIU, S.; IHIDA-STANSBURY, K.; LANDERSBERG, G.; JONES, P.L.; SCALIA, R.; SONG, W.C.; ASSOIAN, R.K.; FITZGERALD, G.A. Myeloid cell 5-lipoxygenase activating protein modulates the response to vascular injury. **Circulation Research**, v.112, n.3, p.432-40, 2013.

WANG, X.; KHALIL, R.A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Advances in Pharmacology**, v.81, p.241-330, 2018.

WANG, Z.; KONG, L.; KANG, J.; VAUGHN, D. M.; BUSH, G.D.; WALDING, A.L.; GRIGORIAN, A.A.; ROBINSON JR., J.S.; NAKAYAMA, D.K.. Interleukin-1 β induces migration of rat arterial smooth muscle cells through a mechanism involving increased matrix metalloproteinase-2 activity. **Journal of Surgical Research**, v.169, p.328–336, 2011.

WANG, M; ZUKAS, AM; HUI Y; RICCIOTTI, E; PURÉ E; FITZGERALD, G.A. Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.39, p.14507-12, 2006

WANG, Z.; RAO, P. J.; CASTRESANA, M.R., NEWMAN, W.H.. TNF-alpha induces proliferation or apoptosis in human saphenous vein smooth muscle cells depending on phenotype. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p.H293–H301, 2005.

WATANABE, N.; IKEDA, U.. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v.6, n.112–120, 2004.

WATANABE, L.; JOHN, D. S.; VALENTE, R. H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARNI, R. K.. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Science**, v.12, n.10, p.2273-2281, 2003.

WESKAMP, G.; KRATZSCHMAR, J.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P.. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. **The Journal of Cell Biology**, v.132, n.4, p.717-726, 1996.

WESTMAN, M.; KOROTKOVA, M.; KLINT, E.; STARK, A.; AUDOLY, L.P.; KLARESKOG, L.; ULFGREN, A.K.; JAKOBSSON, P.J.. Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, n.6, p.1774-80, 2004.

WOLFSBERG, T. G.; STRAIGHT, P. D.; GENERA, R. L.; HUOVILA, A. P. J.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G.; WHITE, J. M.. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a

disintegrin and metalloprotease domain. **Developmental Biology**, v.169, n.1, p.378-383, 1995.

YIN C, MOHANTA SK, SRIKAKULAPU P, WEBER C, HABENICHT AJ. Artery Tertiary Lymphoid Organs: Powerhouses of Atherosclerosis Immunity. **Frontiers in Immunology**, v.10, n.7, p.387. Review, 2016.

ZALTSMAN, A. B.; NEWBY, A. C.. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity. **Atherosclerosis**, v.130, p.61–70, 1997.

ZENG, P.; YANG, J. BLT1: a promising therapeutic approach for atherosclerosis. **Herz**, v.41, n.5, p.441-2, 2016.

ZHANG J; ZOU F; TANG J; ZHANG Q; GONG Y; WANG Q; SHEN Y; XIONG L; BREYER RM; LAZARUS M; FUNK CD; YU Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ promotes injury-induced vascular neointimal hyperplasia through the E-prostanoid 3 receptor. **Circulation Research**, v.113, n.2, p.104-14, 2013.

ZHANG, Y.; MCCLUSKEY, K.; FUJII, K.; WAHL, M.. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms **Journal of Immunology**, v.161, n.6, p.3071-3076, 1998.

ZYCHAR, B.C; DALE, C.S; DERMARCHI, D.S; GONÇALVES, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca crude venom in mice. **Toxicon**, v.55, n.2-3, p. 227-234, 2010.