UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Investigação dos efeitos de toxinas isoladas das
cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* sobre leucócitos,
célula endotelial e rede microcirculatória**

Kaline Waismam

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2008

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Investigação dos efeitos de toxinas isoladas das
cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* sobre leucócitos,
célula endotelial e rede microcirculatória**

Kaline Waismam

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

19.493
São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015112

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

W143i Waismam, Kaline
Investigação dos efeitos de toxinas isoladas das cerdas da
lagarta *Lonomia obliqua* sobre leucócitos, célula endotelial e
rede microcirculatória / Kaline Waismam. -- São Paulo, 2008.
112p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Agente tóxico de origem animal : Toxicologia 2. Imunotoxicologia
I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.94 CDD

Kaline Waismam

**Investigação dos efeitos de toxinas isoladas das
cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* sobre leucócitos,
célula endotelial e rede microcirculatória**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 18/12 de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Processo:06/58643-0

Os sonhos das lagartas

*As lagartas não podem acreditar na lenda das
borboletas – tão antiga entre seu rastejante e
esforçado povo...*

*Mas sua felicidade consiste em relembrar, às
vezes, o absurdo e maravilha desse velho sonho:*

*O de se transformarem, um dia,
em borboletas.*

Mário Quintana

*À minha mãe...Pelo apoio, exemplo e carinho
Se há alguma vitória, a ti eu dedico...*

Agradecimentos

À “profª Ana Marisa Chudzinski-Tavassi” ou para mim simplesmente “tia Ana” por todo apoio, amor e confiança. Pelo incentivo para minha vinda a São Paulo. Pelo exemplo profissional. Não tenho outra palavra senão: Muito Obrigada!

À Profª Dra. Sandra H.P. Farsky pela oportunidade, confiança e orientação para a realização desse trabalho. Pelo exemplo profissional em todo o período de convivência no laboratório.

Ao Igor, pelo amor, amizade e paciência. Por todos os momentos de descontração, pela companhia e por ter facilitado muito minha adaptação em São Paulo. Por participar em tudo na minha vida. Pelo apoio e dedicação constante.

Ao meu irmão por existir em minha vida. Por todos os momentos juntos. Pelas brigas e brincadeiras de toda nossa vida.

Aos meus avós que sempre estiveram presentes, torcendo e rezando pelo meu sucesso.

Aos meus Bisavós (*in memorian*) que sempre pediram pra eu “fazer bonito”.

Ao Edson e Sônia, por todas as conversas e por todas as festas.

Aos meus primos Ana Paula e Tomaz por existirem em minha vida.

Aos meus tios Edílson e Carla. Às minhas primas Thaís e Gabriela por sentirem saudades e por sempre me receberem com muita festa.

Ao pessoal do laboratório: Alexandre, Cristina, Danielle, Fernanda, Gabriela, Rodrigo Soares, Sandra Macedo, não só pelo auxílio mas também pela amizade.

Ao Mário Pacheco, aluno de iniciação científica que me ajudou no início do trabalho.

Aos alunos da Toxicologia, principalmente aos que se tornaram grandes amigos no laboratório e em muitos momentos de diversão: Sidnei, Stella, Marli, Paula, Vânia, Fabiana, Tiago Peixe, Daniel (Erechim), Rafael Caio, Larissa, Filipe.

Ao laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, meu segundo laboratório onde fiz queridas amizades: Fernanda, Janaína, Isabel, Linda, Simone, Luana, e todo o pessoal do laboratório.

Aos meus amigos que estão longe por toda a preocupação, interesse e constante incentivo. Muito obrigada, cheio de saudades!

Ao Rafael e Yara por existirem em minha vida. Pela amizade, companhia e cumplicidade. Afinal, família a gente não escolhe...

Às minhas amigas: Daiana, Patrícia, Priscila, Carine, Lidiane.

Aos funcionários da toxicologia especialmente ao Ângelo, Dalva, Helena, Luzia e Roseli

Aos funcionários do Biotério pela colaboração. Em especial à Flávia, Renata e Fátima.

A todos que de alguma forma, de longe ou de perto, participaram desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Índice

<i>Lista de Figuras</i>	11
<i>Lista de Quadros</i>	13
<i>Lista de Abreviaturas</i>	14
<i>Resumo</i>	15
<i>Abstract</i>	17
<i>Introdução</i>	
1. Lepidópteros	19
1.1. Ciclo Biológico dos lepidópteros.....	19
1.2. A lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	21
1.3. LOPAP e peptídeo 4 – Toxinas obtidas a partir da cerda da Lagarta <i>L. obliqua</i>	25
2. Hemostasia	28
2.1. Rede microcirculatória.....	28
2.2. Endotélio vascular.....	29
3. Eventos inflamatórios na rede microcirculatória: interação leucócito-endotélio	30
4. Apoptose	36
5. Formação de novos vasos	38
5.1. Células endoteliais progenitoras.....	38
5.2. Angiogênese.....	40
<i>Objetivos</i>	44
<i>Material e Métodos</i>	45
1. Animais	45
2. Obtenção do LOPAP e do P4	45
3. Microscopia Intravital	46
3.1. Quantificação dos leucócitos “rollers” e aderidos em vênulas pós-capilares.....	47
3.2. Quantificação do diâmetro de vênulas pós-capilares.....	47
3.3. Avaliação da reatividade vascular.....	48

4. Quantificação da expressão de moléculas de adesão: Citometria de fluxo	
4.1. Em leucócitos circulantes	
4.1.1. Obtenção de leucócitos circulantes.....	48
4.1.2. Quantificação da expressão de L-selectina e $\beta 2$ integrina.....	49
4.2. Em cultura primária de células endoteliais	
4.2.1. Obtenção de culturas primárias de células endoteliais.....	49
4.2.2. Quantificação da expressão de imunoglobulinas.....	50
5. Quantificação de mediadores inflamatórios	
5.1. Obtenção de neutrófilos.....	51
5.2. Obtenção de célula endotelial.....	52
5.3. Dosagem de citocinas.....	52
5.4. Determinação da concentração de óxido nítrico.....	52
6. Avaliação da apoptose e necrose.....	53
7. Quantificação do número de vasos na rede microcirculatória in vivo.....	55
8. Avaliação da migração da célula endotelial.....	58
9. Análise Estatística.....	58
Resultados.....	59
1.Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a rede microcirculatória.....	59
2.Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio	
2.1. Efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão em leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes.....	65
2.2. Efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão em célula endotelial em cultura.....	68
3.Efeitos da aplicação do LOPAP e do P4 sobre a liberação de mediadores inflamatórios	
3.1. Da célula endotelial.....	73
3.2. De neutrófilo.....	73

4.Efeitos da aplicação do LOPAP e do P4 sobre a apoptose de células endoteliais e neutrófilos.....	77
5.Efeitos do L-NAME sobre a produção de NO e a proteção à morte celular induzidas pelo LOPAP e P4.....	79
6.Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre o número de vasos na rede microcirculatória dorsal de camundongos.....	84
7.Efeitos da aplicação tópica do P4 sobre a formação de novos vasos na rede microcirculatória dorsal de camundongos induzida por fator de crescimento.....	87
8.Efeitos do tratamento in vitro de LOPAP e P4 sobre a migração de células endoteliais.....	89
<i>Discussão.....</i>	91
<i>Conclusões.....</i>	100
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	101
<i>Anexos.....</i>	107

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico da metamorfose da *Lonomia obliqua*.

Figura 2: Foto da lagarta *Lonomia obliqua*.

Figura 3: Sintomatologia característica do acidente com a lagarta *Lonomia obliqua*.

Figura 4: Esquema de formação de novos vasos.

Figura 5: Implantação da câmara dorsal em camundongos Swiss.

Figura 6. Efeitos da aplicação tópica do LOPAP (A) e do P4 (B) sobre o diâmetro de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos.

Figura 7: Efeitos da aplicação tópica de 30µg/mL de LOPAP e de P4 sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos.

Figura 8: Efeitos da aplicação tópica de 300µg/mL de LOPAP (A) e de P4 (B) sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos.

Figura 9: Efeitos da aplicação tópica de 1000µg/mL de LOPAP e de P4 sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos.

Figura 10: Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a reatividade vascular do leito mesentérico de ratos Wistar machos.

Figura 11: Efeitos do LOPAP e P4 sobre a expressão de L-selectina em PMNs circulantes.

Figura 12: Efeitos do LOPAP e P4 sobre a expressão de β_2 -integrina em PMNs circulantes.

Figura 13: Foto da caracterização de células endoteliais em microscopia confocal pela marcação com PECAM-1.

Figura 14: Efeitos do LOPAP e do P4 na expressão de ICAM-1 em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster.

Figura 15: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a expressão de VCAM em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster.

Figura 16: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a expressão de PECAM em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster.

Figura 17: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a secreção de IL-6, IL-10 e TNF- α pela célula endotelial em cultura.

Figura 18: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a produção de óxido nítrico e citocinas IL-6, ou TNF- α por neutrófilos.

Figura 19: Quantificação da viabilidade de neutrófilos mantidos em cultura por 24 horas, em condições basais ou com simultâneas aplicações de 3,0 μ g/mL de LOPAP ou do P4.

Figura 20: Quantificação da viabilidade de células endoteliais mantidas em cultura por 24 horas, em condições basais ou com simultâneas aplicações de 3,0 μ g/mL de LOPAP ou do P4.

Figura 21: Efeito do L-NAME na síntese de NO por neutrófilos.

Figura 22: Efeito do L-NAME no processo de apoptose de neutrófilos.

Figura 23: Efeito do L-NAME (1M) na apoptose de células endoteliais.

Figura 24: Efeito da aplicação tópica de P4 sobre os vasos da microcirculação dorsal de camundongos.

Figura 25: Efeito da aplicação tópica de LOPAP sobre os vasos da microcirculação dorsal de camundongos.

Figura 26: Efeito da aplicação tópica de ECGS simultaneamente com P4 (300 μ g/mL) sobre os vasos da microcirculação dorsal de camundongos.

Figura 27: Efeito da aplicação de 3,0 μ g/mL de LOPAP ou P4 na migração de células endoteliais de camundongo.

Lista de Quadros

Quadro 1: Classificação dos acidentes causados por *Lonomias sp* e utilização do SALon.

Quadro 2: Delineamento experimental dos grupos de camundongos tratados com LOPAP, P4 e/ou ECGS..

Lista de Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
DMEM	Meio de cultura para células
ECGS	Suplemento de fatores de crescimento celular
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HPLC	“High Performance liquid chromatography”
HUVEC	Célula endotelial de cordão umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
LOPAP	“ <i>Lonomia obliqua</i> prothrombin activator activator protease”
LPS	Lipopolissacarídeo
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
NO	Óxido Nítrico
NOR	Noradrenalina
P4	Peptídeo 4
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adesão de célula endotelial/plaquetas
SF	Soro fisiológico
SFB	Soro fetal bovino
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease) é uma serino protease isolada das cerdas da Lagarta *Lonomia obliqua* que induz efeitos sobre a coagulação sangüínea, semelhantes ao extrato de cerdas bruto. Recentemente, foi obtido um peptídeo do LOPAP, P4, que parece possuir efeitos similares à proteína. No sentido de complementar os dados sobre estas toxinas, este estudo investigou os efeitos do LOPAP ou do P4 sobre interações leucócito-endotélio *in vivo*; expressão de moléculas de adesão, síntese de mediadores inflamatórios, apoptose e necrose de leucócitos e célula endotelial, além de suas possíveis ações sobre a formação de novos vasos.

Aplicação tópica de 30µg/mL ou 300µg/mL (10µL) de LOPAP ou de P4 na rede microvascular do mesentério de ratos Wistar machos não alterou o diâmetro de vênulas pós-capilares, as interações dos leucócitos ao endotélio, nem a reatividade microvascular frente à acetilcolina ou noradrenalina. Somente a concentração de 1000µg/mL aumentou o número de leucócitos aderidos à parede vascular, simultaneamente a estases intermitentes nos vasos da microcirculação.

Ensaio de citometria de fluxo mostraram que a incubação de LOPAP ou P4 (300µg/mL) não modificou a expressão de L-selectina e β_2 -integrina em neutrófilos circulantes obtidos de ratos Wistar. Por outro lado, incubações do LOPAP ou do P4 com célula endotelial (cultura primária obtida do músculo cremaster de ratos Wistar; 300µg/mL) induziram a expressão da molécula ICAM-1, e somente o P4 promoveu a expressão de VCAM-1. Diferentemente, nenhuma das toxinas alterou a expressão de PECAM-1.

Ensaio imunoenzimáticos realizados em sobrenadantes de neutrófilos e de célula endotelial incubadas com LOPAP ou P4 (300µg/mL) mostraram que as toxinas não alteraram a secreção de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por neutrófilos; as toxinas não induziram a secreção de TNF- α pela célula endotelial, mas aumentaram a secreção de IL-6 e IL-10. A concentração de óxido nítrico (NO), quantificado pela reação de Griess,

estava aumentada nos sobrenadantes dos dois tipos celulares incubados com LOPAP ou P4.

A incubação de LOPAP ou P4 com neutrófilos ou célula endotelial não alterou a viabilidade celular, mas preveniu a apoptose da célula endotelial ou neutrófilo provocada pela carência de soro bovino fetal. A incubação simultânea com L-NAME (1 mM) reduziu a proteção conferida pelo LOPAP ou pelo P4.

A investigação dos efeitos das toxinas sobre a formação da rede microcirculatória foi realizada em camundongos Swiss, machos, utilizando o modelo da câmara dorsal por microscopia intravital. A aplicação tópica do LOPAP ou P4 (30µg/mL, 300µg/mL; 10µL; 3 doses a cada 96 horas) no leito microvascular dorsal reduziu significativamente o número de vasos na rede microcirculatória em condições basais. Adicionalmente, o tratamento com P4 inibiu a formação de novos vasos provocada pela aplicação tópica de suplemento de fatores de crescimento vascular. O tratamento de célula endotelial de microcirculação de camundongos imortalizadas (tENd) com LOPAP ou P4 (300µg/mL) reduziu a capacidade de migração destas células.

Em conjunto, os dados obtidos até o momento mostram que o LOPAP e o P4 não induziram as interações leucócito-endotélio *in vivo* e que a secreção de mediadores por neutrófilos e célula endotelial, como o NO, podem estar envolvidos com suas atividades anti-apoptótica. Ademais, o LOPAP e o P4 inibem o crescimento de novos vasos, e um dos possíveis mecanismos pode ser a interferência nos mecanismos de migração da célula endotelial.

Abstract

LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease) is a serine protease isolated from the crude extract of *Lonomia obliqua* caterpillar, which induces effects on blood coagulation comparable to the extract. Recently it was obtained a peptide fragment from LOPAP, P4, with similar activities with the protein. This study aimed to complete data about these toxins, LOPAP and P4, on *in vivo* leukocyte-endothelial interactions; adhesion molecule expressions, synthesis of inflammatory mediators, necrosis and apoptosis of neutrophils and endothelial cells, besides possible actions on angiogenesis.

Topical applications of 30µg/mL or 300µg/mL (10µL) of LOPAP or P4 on microvascular network of mesentery of Male Wistar rats did not affect the diameter of postcapillary venules, leukocyte-endothelial interactions, either vascular reactivity to acetylcholine or norepinephrine. Only topical application of 1000µg/mL (10 µL) promoted increment on the number of leukocytes adhered to vessel wall, simultaneously to intermittent blood stasis in the microvascular network.

Flow cytometry assays showed that incubations with LOPAP or P4 (300µg/mL) did not modify the expression of L-selectin or β 2-integrin in neutrophils from Male Wistar rats. On the other hand, incubations of LOPAP or P4 with primary cultured endothelial cells evoked expressions of ICAM-1, and only incubation with P4 promoted expression of VCAM-1. Differently, the treatments did not affect PECAM-1 expression in endothelial cells.

Immunoenzymatic assays carried out in supernatants of neutrophils and endothelial cells incubated with LOPAP or P4 (300 µg/mL) showed that both toxins did not alter the basal secretion of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α) by neutrophils; both toxins did not promote secretion of TNF- α by endothelial cells, however they enhanced the secretion of IL-6 and IL-10. Concentrations of nitric oxide (NO), quantified by Griess reaction, were enhanced in the supernatant of neutrophils or endothelial cells incubated with LOPAP or P4.

LOPAP or P4 treatments did not alter the viability of neutrophils or endothelial cells, but prevented the apoptosis of both type cell caused by fetal bovine serum deprivation. Simultaneous incubation with L-NAME (1mM) and LOPAP or P4 reduced the protection on apoptosis exerted by the toxins.

The action of toxins on formation of microcirculatory network was investigated in Male Swiss mice. Topical application of LOPAP or P4 (30µg/mL, 300µg/mL; 10µL; 3 times each 96 hours) in the microvascular network significantly reduced the number of vessels in basal conditions. Additionally, treatment with P4 inhibited the new vessel formation provoked by topical application of vascular growth factor supplement. Immortalized endothelial cells of mice (tEnd) incubated with toxins presented lower migration than cells incubated with saline.

Together, data herein obtained showed that LOPAP and P4 did not evoke in vivo leukocyte-endothelial interactions and secretions of chemical mediators by neutrophils and endothelial cells, as NO, seem to be related to anti-apoptotic activities. Additionally LOPAP or P4 inhibit the microcirculatory network formation, by interfering, at least in part, by altering the migration of endothelial cells.

Introdução

1. Lepidópteros

Os lepidópteros são constituintes chaves de muitos ecossistemas terrestres e uma das pragas mais sérias da agricultura e das florestas (Yack e cols, 2001). Além disso, podem ser providas de veneno capaz de provocar acidentes em humanos.

As lagartas compreendem a fase larvária de lepidópteros, com algumas exceções, na fase de larva são fitófagos e, por isso, são consideradas pragas para a agricultura. São conhecidas mais de 165.000 espécies de borboletas e mariposas. Esses animais são classificados no filo Arthropoda, subfilo Mandibulata, classe Insecta da ordem Lepidoptera (Lorini, 1999).

1.1. Ciclo Biológico dos lepidópteros

- Ovos – após o acasalamento, a fêmea faz a postura dos ovos nas folhas da planta que servirá de alimento para as futuras lagartas. O período embrionário é de aproximadamente 17 dias.
- Larvas (lagartas) – esta fase é de aproximadamente 90 dias e as larvas são encontradas nos troncos das árvores e arbustos, alimentando-se de folhas. Apresentam hábitos gregários, vivendo em grupos. Este estágio é dividido em 6 fases de desenvolvimento denominadas de instares.
- Pupa – no final da fase larvária, as lagartas se posicionam no tronco da árvore, próximo ao solo, onde se transformaram em pupas. As pupas permanecem no solo por um período que pode variar de 30 a 100 dias, nos meses de inverno, dependendo das condições climáticas.
- Fase adulta – são mariposas que vivem em torno de 8 dias apenas, nos quais fazem o acasalamento e a dispersão, reiniciando o ciclo na natureza.

Foto: Roberto Henrique Pinto de Moraes

Figura 1: Ciclo biológico da metamorfose da *Lonomia obliqua*. 1) Mariposa fêmea que mede aproximadamente 8 cm de ponta a ponta das asas. 2) Mariposa Macho: mede 7 cm de ponta a ponta das asas. 3) Ovos: medem 1 mm de diâmetro. 4) Lagarta de último instar: 7 cm de comprimento. 5) Pupa em fase de metamorfose para adulto alado : mede 4 cm de comprimento.

As cerdas das lagartas (espinhos) têm estrutura pontiaguda e queratinizada. Quando em contato com partes descobertas da vítima, as cerdas quebram-se e o líquido urticante é introduzido na pele do indivíduo (Veiga e cols, 2001). O primeiro acidente relatado causado por lagartas, que ocasionou, entre outros sintomas, a presença de sangue na saliva e na urina da vítima, foi notificado por Alvarenga em 1912.

1.2. A lagarta *Lonomia obliqua*

As lagartas do gênero *Lonomia* apresentam importância na saúde pública devido à gravidade de seus acidentes. As lagartas da família dos saturnídeos, que incluem o gênero *Lonomia* sp, são as responsáveis pelos acidentes em algumas regiões específicas da América Latina. As duas espécies predominantes são as *L. achelous* (Venezuela, Guiana e região norte do Brasil) e *L. obliqua* (região sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina) por causarem acidentes graves caracterizados por síndrome hemorrágica (Arocha-Piñango e cols, 1981; Kelen e cols. 1995).

Conhecida popularmente como taturana, a *L. obliqua* é esverdeada, com manchas e listras, que muitas vezes mimetizam as plantas em que habitam. Possuem cerdas, simetricamente dispostas ao longo do dorso, em forma de espinhos ramificados e pontiagudos, de aspecto arbóreo (Figura 2).

Foto: Roberto Henrique Pinto de Moraes

Figura 2: Foto da lagarta *Lonomia obliqua*.

As lagartas do gênero *Lonomia* possuem hábitos gregários, vivendo originalmente em árvores altas. Acredita-se que o desmatamento e a extinção de um ou mais dos seus predadores naturais, sejam os principais motivos da expansão populacional da *L. obliqua*. Assim, recentemente as lagartas têm sido encontradas em regiões urbanas, perto de casas, provavelmente atraídas pela luz destas regiões.

Os inimigos naturais da *L. obliqua* são as larvas de moscas e vespas que perfuram o tegumento das lagartas e se alimentam de estruturas internas, impedindo o prosseguimento do seu ciclo biológico na passagem para pupa. (Moraes, 2002).

O contato acidental com as cerdas das taturanas desencadeia os sintomas da intoxicação. A gravidade dos acidentes é proporcional à quantidade de taturanas presentes nas colônias, da intensidade do contato e das predisposições do paciente.

No Brasil, os primeiros casos isolados de acidentes foram descritos no Amapá e Ilha de Marajó em 1982. A partir de 1989, o problema passou a assumir dimensões epidêmicas em uma área restrita na região sul do país, abrangendo localidades em torno das cidades de Chapecó (SC) e Passo Fundo (RS) e mais recentemente no Paraná e São Paulo (Ministério da Saúde, 1998). Nos últimos dez anos foram registrados mais de mil casos nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (Zannin e cols. 2003).

O acidente causado pela lagarta *L. obliqua* é representado por um quadro de dermatite urticante, cefaléia, mal-estar geral, náuseas, vômitos e dor muscular. Adicionalmente, após um período que pode variar entre 1 a 48 horas, instala-se um quadro de discrasia sangüínea (alteração na proporção dos elementos do sangue), acompanhado ou não de manifestações hemorrágicas (Figura 3). Podem surgir equimoses; hematomas de aparecimentos espontâneos, provocados por traumas ou em lesões cicatrizadas; hemorragias de cavidades mucosas (gengivorragia, hemorragia nasal); hematúria; sangramentos em feridas recentes; hemorragias abdominais, pulmonares e glandulares (Fritzen e cols. 2005).

Figura 3: Sintomatologia característica do acidente com a lagarta *Lonomia obliqua*. Em A, a foto da hematúria (eliminação de sangue na urina) e em B a equimose e os hematomas.

Na tentativa de esclarecer a fisiopatologia do envenenamento, Zannin e colaboradores (2003) avaliaram parâmetros de coagulação e fibrinólise em plasma de 105 pacientes e demonstraram que as disfunções da cascata da coagulação ocorrem pelo consumo de seus fatores, com conseqüente coagulação intravascular disseminada, fibrinólise secundária e hemorragia. Associados a este estudo, dados subseqüentes mostraram que os efeitos da intoxicação são decorrentes de toxina(s) presente(s) nas cerdas das taturanas. Essas toxinas que desencadeiam a coagulopatia intravascular disseminada diminuem drasticamente as concentrações de fibrinogênio, fator V, fator VIII, além da detecção de complexos trombina-antitrombina, de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina e de fibrina cross-linked (D-dímeros) (Fritzen e cols. 2005).

Embora o efeito hemorrágico desencadeado pelas espécies *obliqua* e *achelous* seja semelhante, os mecanismos envolvidos parecem ser diferentes, uma vez que no acidente pela *L. achelous*, os pacientes desenvolvem fibrinólise primária devido a componentes altamente fibrinolíticos presentes no veneno daquele animal, enquanto que no envenenamento causado pela *L. obliqua* ocorre coagulopatia de consumo (Chudzinski-Tavassi e cols 2001).

O quadro de envenenamento é classificado de acordo com a intensidade dos sintomas apresentados pela vítima e os tratamentos são referentes à gravidade do acidente. O SALon, soro anti-lonômico desenvolvido pelo Instituto Butantan, é geralmente aplicado em quadros moderados a graves, como estão melhor descritos no quadro abaixo.

CLASSIFICAÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	TRATAMENTO
LEVE (primeiras horas após contato)	Sintomas locais, sem alterações da coagulação (exames normais) ou sangramentos até 12 horas após o contato;	Alívio da dor. Não necessitam de tratamento específico (SALon). Pacientes podem ser liberados.
MODERADO	Sintomas locais, alterações da coagulação com e sem manifestações hemorrágicas na pele e/ou em mucosas (gengivorragia, equimose, hematoma) hematúria e sem alterações hemodinâmicas;	Tratamento específico com 5 ampolas de SALon diluídas em 250mL de SF IV/30min
GRAVE	Alteração da coagulação, manifestações hemorragias em vísceras (hematêmese, sangramento pulmonar, hemorragia intracraniana) e com alterações hemodinâmicas e/ou falência de múltiplos órgão ou sistemas.	Tratamento específico com 10 ampolas de SALon diluídas em 250mL de SF IV/30min

Quadro 1: Classificação dos acidentes causados por *Lonomias sp* e utilização do SALon.

Embora a estratégia terapêutica para o envenenamento lonômico esteja satisfatoriamente bem estabelecida, os estudos com os extratos das cerdas continuam no sentido de compreender melhor a fisiopatologia do envenenamento e da obtenção de toxinas que possam ter aplicação terapêutica ou científica.

1.3. LOPAP e peptídeo 4 – Toxinas obtidas a partir da cerda da Lagarta *L. obliqua*

Ensaio experimentais, usando ratos ou camundongos como modelos animais, foram conduzidos para caracterizar a(s) toxina(s) presente(s) no veneno contido nas cerdas e responsáveis pelos efeitos na cascata da coagulação descritos acima. Dentre estas, uma protease ativadora de protrombina – proteína tetramérica de 69 kDa, denominada LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease), com características de serinoproteases e atividade pró-coagulante em ratos, foi isolada e seus efeitos têm sido avaliados. Sua administração *in vivo* tornando o sangue do animal incoagulável, predominantemente pelo consumo do fibrinogênio, uma vez que houve redução de somente 30% no número de plaquetas (Chudzinski-Tavassi e cols, 2001). No entanto, não se pode descartar a possibilidade da toxina alterar a função plaquetária *in vivo*, porque o LOPAP é capaz de inibir completamente a agregação de plaquetas induzida por colágeno *in vitro* (Fritzen e cols 2005).

A partir da toxina isolada, uma biblioteca de cDNA em plasmídeos foi construída. A utilização de *primers* específicos, desenhados a partir do N-terminal da proteína nativa, permitiu o isolamento de um clone correspondente ao LOPAP, que foi expresso em *E.coli* e sua seqüência determinada (rLOPAP), com tamanho de 21KDa. Sua estrutura permite que a produção em grande escala, com a inserção de parte do DNA da taturana em bactérias (Chudzinski-Tavassi e cols, 2006).

Após síntese, verificou-se que esta proteína apresenta aproximadamente 35% de identidade com proteínas da família das lipocalinas (Reis e cols, 2001). As lipocalinas são integrantes de uma família de proteínas com função de armazenar e transportar compostos orgânicos hidrofóbicos e/ou quimicamente sensíveis, envolvidas na gênese do câncer, resposta imune e na regulação celular (Flower 1996, 2000).

Os dados obtidos em estudos clínicos após o acidente e os provenientes de estudos experimentais realizados com o extrato bruto ou com o LOPAP mostraram que o efeito anti-coagulante é prolongado (até dias) (Zannin e cols, 2003). O exato mecanismo da longa duração do efeito não está descrito, mas uma das hipóteses aventadas foi o acúmulo desta toxina na célula endotelial. Assim, estudos foram realizados em culturas de células endoteliais humanas (HUVECs) e os dados obtidos mostraram que a aplicação da toxina não alterou a atividade do fator tecidual, do ativador de plasminogênio nem a liberação do fator de von Willebrand dos corpúsculos de Weibel-Palade (Chudzinski-Tavassi e cols. 2001). No entanto, a toxina induziu liberação de NO, prostaglandina I₂ e interleucina-8, as expressões das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina (Fritzen e cols. 2005) e inibiu a apoptose induzida pela carência de soro fetal bovino. Neste último contexto, a morte celular por apoptose foi significativamente menor em HUVEC incubadas com LOPAP, no entanto a necrose celular foi equivalente em células testes e controles e nunca ultrapassou a 2% (Fritzen e cols. 2005).

Se associados, os dados não contribuíram efetivamente para adicionar efeitos aos mecanismos da incoagulabilidade sanguínea, mas mostraram que a toxina exerce efeitos distintos na célula endotelial envolvidos em diferentes quadros fisiopatológicos. Passou-se, então a aventar que o LOPAP poderia afetar a reatividade vascular e o processo inflamatório, uma vez que a prostaciclina I₂ e o óxido nítrico são potentes vasodilatadores e mediadores da resposta inflamatória, além dos mecanismos de adesão celular, porque tanto a E-selectina, como a ICAM-1 são moléculas relevantes no recrutamento de células brancas para processos inflamatórios (para revisões ver Robbins e Cotran, 2005; Michiels, 2003).

Outra linha de investigação com a toxina tem sugerido seu papel sobre diferentes células que não a endotelial, uma vez que sua aplicação local no subcutâneo dorsal de camundongos favorece a remodelação tecidual e o processo de cicatrização após lesão física (Chudzinski-Tavassi, comunicação pessoal).

As novas descobertas sobre as ações do LOPAP, além do seu reconhecido papel nas alterações da cascata da coagulação observadas no envenenamento, delinearam os estudos para caracterização de seqüências peptídicas responsáveis pelos diferentes efeitos. A partir da seqüência de aminoácidos do LOPAP, foram, então, desenhados quatro peptídeos: P1 e P3, com 20 resíduos de aminoácidos; P2 com 19 resíduos e P4 com 11 resíduos. Os peptídeos foram sintetizados pela ORPEGEN Pharma (Organic Peptidic genetic pharmaceutic, Alemanha), e analisados quanto à massa molecular por espectrometria de massa MALDI-MS e quanto ao grau de pureza por HPLC.

Os peptídeos foram testados *in vitro* quanto à atividade procoagulante, ação citoprotetora em culturas de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECS) e na ação indutora de moléculas de matriz em cultura de fibroblastos humanos.

O P4 apresentou efeito anti-apoptótico, sem nenhuma ação no sistema de coagulação (Chudzinski-Tavassi, comunicação pessoal) e, assim, foi o escolhido para os estudos posteriores que visam caracterizar os efeitos celulares do LOPAP.

Em conjunto, a literatura apresentada acima sugere que o LOPAP seja um componente importante da peçonha obtida das cerdas desta lagarta. Ademais, os dados obtidos durante as investigações dos mecanismos de ação do LOPAP têm fornecido subsídios para potenciais efeitos em diferentes tipos celulares. Desta forma, os conhecimentos das ações do LOPAP e de suas seqüências peptídicas poderão contribuir, efetivamente, para a elucidação da gênese do envenenamento, além da caracterização de novas ações da toxina.

2. Hemostasia

A hemostasia é definida como o conjunto de mecanismos, utilizado pelo organismo para manter o sangue fluido no interior dos vasos, impedindo a formação de trombos em vasos intactos e desencadeando uma série de reações que resultam na reparação de lesões na parede vascular, impedindo uma extensa hemorragia (Bick, 2002).

Dentro deste quadro, os vasos que compõem a rede microcirculatória e as células que os revestem, são fundamentais para os hemostáticos.

2.1. Rede microcirculatória

A rede microcirculatória é formada por vasos com diâmetros menores que 100 µm e compreende arteríolas que se ramificam em uma extensa rede de capilares, os quais drenam para vênulas pós-capilares. As paredes dos vasos sanguíneos diferem quanto à sua composição e, em parte, a constituição das mesmas define as funções vasculares (Brain, 1994).

Os capilares são os vasos sanguíneos de menor calibre do sistema cardiovascular. É onde ocorrem as trocas de gases e metabólitos entre as células dos tecidos e o sangue. Um importante componente da parede do capilar é a célula endotelial, revestidas por células dotadas de longos processos citoplasmáticos, denominadas pericitos. Os pericitos podem cobrir toda a circunferência do capilar. Extensas ramificações de capilares são encontradas em tecidos com alta atividade metabólica (para revisão ver Brain, 1994).

Os capilares drenam o sangue para as vênulas pós-capilares, cujas paredes são formadas pela célula endotelial e pericitos. Com a progressão do diâmetro venular, uma camada de músculo liso começa a se desenvolver. Nas vênulas pós-capilares a velocidade de fluxo sanguíneo, determinado pela drenagem dos capilares, é menor que o encontrado em arteríolas. A estrutura frágil da parede vascular, características da membrana da célula endotelial

(descrita abaixo), bem como a hemodinâmica favorecem a ocorrência dos eventos microcirculatórios da resposta inflamatória (Michiels, 2003).

As arteríolas regulam o fluxo sanguíneo para os leitos capilares e por esta razão são chamados de vasos de resistências. Possuem uma parede bem definida composta pela célula endotelial e uma ou duas camadas de músculo liso. Pela habilidade de responderem prontamente a agentes vasoativos, contraindo ou dilatando, as arteríolas controlam o fluxo sanguíneo local e estão, assim, envolvidos na gênese da hipertensão.

A breve descrição acima mostra que a perfeita atividade dos vasos da microcirculação é essencial para a manutenção da integridade tecidual, visto que fisiologicamente são os responsáveis pelas trocas entre o sangue circulante e o tecido, além de responderem especificamente a estímulos de naturezas distintas. Assim, alterações nos vasos da microcirculação estão relacionadas à gênese de diferentes doenças, entre as quais as hipertensivas, metástases tumorais e as de origem inflamatórias (Michiels, 2003).

2.2 Endotélio vascular

O endotélio vascular forma uma barreira seletiva, separando as células do sangue e proporcionando a troca de gases e de moléculas do meio interno com o externo, além disso, mantém a fluidez do sangue e regula o tônus vascular.

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Possui papel na manutenção do fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celular e controlando a resposta inflamatória (Lokmic Z, Mitchell GM; 2008).

Os primeiros autores que demonstraram de forma clara o papel do endotélio na relação entre a acetilcolina e a vasodilatação *in vivo* foram Furchgott e Zawadzki (Furchgott e cols, 1980). Observaram que, em algumas preparações

isoladas de anéis de aorta torácica descendente de coelhos, a acetilcolina não produzia a vasodilatação esperada, ao contrário, produzia vasoconstrição (resposta paradoxal). Entretanto, isto ocorria devido à retirada involuntária do endotélio vascular durante a preparação do vaso. Com a preservação da integridade do vaso sangüíneo, pôde-se isolar NO produzido pelo endotélio, mediador da ação da acetilcolina (vasodilatação endotélio-dependente).

Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras como fator de hiperpolarização derivado do endotélio, prostaciclina, cininas e substâncias vasoconstritoras, entre as quais angiotensina II e endotelina. Quando a função do endotélio é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência à vasodilatação (Fisher, 2008; Garaliene, 2008)

É de fundamental importância que a fluidez da membrana plasmática endotelial seja mantida, pois permite o arranjo tridimensional adequado dos receptores de superfície, possibilitando ligações eficientes com diversas moléculas circulantes para a correta sinalização intracelular.

3. Eventos inflamatórios na rede microcirculatória: interação leucócito-endotélio

Logo nos estágios iniciais do processo inflamatório, mediadores químicos de origem plasmática ou tecidual ligam-se em receptores da membrana endotelial da microcirculação próxima à área lesada, promovendo uma série de modificações bioquímicas e morfológicas, responsáveis pela intensa vasoconstrição, seguida de dilatação e aumento de permeabilidade vascular. O aumento do fluxo sanguíneo local pela vasodilatação, a qual primariamente envolve arteríolas, capilares e vênulas, promove hiperemia e aquecimento local, e a contração das células endoteliais de vênulas pós-capilares, leva ao aumento na permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento de proteínas plasmáticas e plasma, formando edema (para revisão ver Robbins & Cotran, 2005). Estas alterações na

hemodinâmica microvascular são fundamentais para a migração de leucócitos para área inflamada, como descrita abaixo.

Em condições normais, as células brancas no sangue periférico circulam na posição mais central do fluxo, sendo circundadas pelos eritrócitos. Logo nos estágios iniciais do processo inflamatório, as alterações hemodinâmicas citadas acima, promovem o “roleaux” e modificações moleculares nas membranas do endotélio e dos leucócitos circulantes, que passam a aderir, momentaneamente, ao endotélio (comportamento “rolling”). Com o decorrer do processo, os leucócitos aderem firmemente à parede vascular (aderência). Em conjunto, estes fenômenos são denominados de interação leucócito-endotélio e são os passos fundamentais e essenciais para a migração leucocitária em direção ao foco de adesão (para revisão ver Harlan, 1985; Wiedle e cols, 2001).

Atualmente, é amplamente descrito que a interação leucócito-endotélio é mediada pela expressão e/ou ativação de receptores glicoprotéicos, denominados de moléculas de adesão, nas membranas celulares.

O comportamento “rolling” é mediado pela expressão de moléculas pertencentes à família das selectinas, expressas nos leucócitos (L-selectina ou CD62L) e nas células endoteliais (P-selectina ou CD62P e E-selectina ou CD62E). Estas moléculas foram assim denominadas porque seu domínio de ligação na região amino terminal é semelhante ao carboidrato lectina e hoje se sabe que os ligantes para estas moléculas são carboidratos expressos constitutivamente nas membranas celulares. Apesar da ligação a estes carboidratos ser predominante, parece não ser exclusiva, uma vez que há descrições de interações com glicolípides, proteoglicanos e integrinas (Derry e cols, 1999; Li e cols, 1999). A E-selectina e a P-selectina encontradas na superfície endotelial funcionam como sítios de ligação para a L-selectina. A L-selectina está constitutivamente presente nas microvilosidades das membranas da maioria dos leucócitos e tem como função a fixação inicial dos leucócitos ao endotélio vascular.

As integrinas são glicoproteínas transmembrana, que participam da organização tissular e funcionam como receptores para outras moléculas de adesão (Diamond e cols. 1994). Medeiam a interação célula/célula e matriz/célula e são assim denominadas pela habilidade de integrar o meio extra e intracelular. Por este motivo, funcionam como transdutores de sinais em diferentes processos fisiopatológicos, influenciando programas genéticos que definem, conseqüentemente, o fenótipo e a função celular (para revisões ver Rossetti e cols. 2002; Hogg e cols. 2002). Todas as integrinas são heterodímeros compostos de uma subunidade α e uma subunidade β . A perfeita associação destas subunidades α a uma subunidade β comum determinou a classificação destas moléculas em sub-famílias. Desta forma, as integrinas são agrupadas em pelo menos 4 sub-famílias. As moléculas da subfamília β_2 ou complexo CD18, composta de 4 moléculas - CD11a/CD18 ou LFA-1 "lymphocyte function associated 1", CD11b/CD18 ou Mac-1 "macrophage antigen-1", CD11c/CD18 ou gp150,95 e CD11d/CD18 - são expressas exclusivamente em leucócitos e as três primeiras medeiam a aderência ao endotélio e sua subsequente diapedese. Neste processo, os ligantes para as β_2 integrinas são as moléculas que compõem a família das imunoglobulinas - ICAMs "intercellular cell adhesion molecule" 1,2,3,4, VCAMs "vascular cell adhesion molecule" e PECAM-1 "platelet endothelial cell adhesion molecule-1", além da fração C3b do complemento e de proteoglicanos. A adesão celular mediada pelas β_2 integrinas é decorrente de expressão qualitativa, uma vez que podem estar presentes nas células quiescentes em estado inativo; ou quantitativa, proveniente de mobilização de "pools" intracelulares localizados em grânulos específicos (para revisão ver Gahmberg e cols, 1997; Harris e cols, 2000). Vários agentes, entre os quais estímulos inflamatórios e mediadores químicos, estimulam especificamente cada tipo de expressão (McDowall, 2003; para revisão ver Harris e cols, 2000).

As imunoglobulinas são membros de uma superfamília de moléculas de adesão caracterizadas por um domínio extracelular constituído por várias unidades repetidas homólogas a domínios de imunoglobulina G, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. São expressas em diferentes tipos celulares, mas como citado acima são as ligantes no endotélio para as integrinas nos processos de aderência e diapedese. As expressões de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, mas na presença de estímulos inflamatórios suas concentrações na membrana endotelial são extremamente aumentadas (para revisão ver Huo e Ley, 2001). A localização constitutiva e predominante de PECAM-1 nas junções interendoteliais é fundamental para a diapedese. A ICAM-1 é constitutivamente expressa no epitélio, nos fibroblastos e a baixos níveis nas células endoteliais. A VCAM-1 também é expressa pelas células endoteliais e algumas células dendríticas. Já a PECAM-1 é expressa constitutivamente pelas células endoteliais, leucócitos e plaquetas.

Da mesma forma que as alterações hemodinâmicas e vasculares que ocorrem no início do processo inflamatório, a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio microvascular também é mediada pela ação de substâncias químicas, geradas ou secretadas por células envolvidas no processo inflamatório. A ação destas substâncias é complexa e altamente específica. Dentre estes cabe salientar que as interleucinas, quimiocinas, derivados do ácido araquidônico, óxido nítrico, fator de agregação plaquetária, cininas, histamina, serotonina e fatores de crescimento medeiam especificamente à expressão de moléculas de adesão (para revisão ver Cotran & Mayadas-Norton, 1998).

Além de promover a expressão de moléculas de adesão, as citocinas, por serem considerados mediadores de reações imunes de origens inatas e adquiridas, onde exercem inúmeras funções.

Até o momento, um grande número de citocinas já foi descrita, com papel pró ou antiinflamatórios (Galliera, 2008). Dentre esta variedade de citocinas, muitas já possuem suas ações bem estabelecidas. A IL-6, monômero de 129 aminoácidos, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, bem como o crescimento de linfócitos B. É produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais e fibroblastos por agentes desencadeadores de resposta imune inata ou adquirida ou por outras citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e TNF- α . (Abbas e cols, 2007; Larsson e cols, 2008).

As quimiocinas são citocinas liberadas nas fases iniciais da inflamação que tem características quimiotraentes, induzindo a quimiotaxia por ação direta nas células adjacentes. A IL-8, também chamada de CXCL8, foi a primeira quimiocina a ser clonada e caracterizada. Além das funções de direcionamento dos leucócitos na imunidade adaptativa, a IL-8 também atua no desenvolvimento e migração dos linfócitos e na angiogênese (Janeway e cols, 2007; Barnes e cols, 1998). A IL-8 é produzida por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, e tem função importante na angiogênese (Abbas e cols, 2007).

As duas formas de IL-1 (α e β) se ligam aos mesmos receptores e possuem efeitos biológicos idênticos, incluindo a adesão da célula endotelial e a estimulação da produção de quimiocina pelas células endoteliais e macrófagos. Essas citocinas são produzidas principalmente pelos fagócitos mononucleares ativados (Larsson e cols, 2008; Abbas e cols, 2007).

Já a IL-10 é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e algumas células T auxiliares. Desempenha um papel tanto anti quanto pró-inflamatório, mantendo o controle homeostático das reações imunes inatas e mediadas por células (Larsson e cols, 2008; Abbas e cols, 2007).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina diretamente envolvida nas reações de fase aguda nos processos de inflamações sistêmicas. Seu principal papel está relacionado à regulação e equilíbrio da ação das células imunes (Nedwin e cols, 1985). O TNF- α é o mais importante e o mais estudado fator de necrose tumoral. Para Loyola et al (2005) sua função está diretamente ligada ao aumento da expressão de todas as citocinas pró-inflamatórias, a ativação da transcrição de fatores nucleares e, especialmente, do fator NF-kappa- β , responsável pela sua ativação.

É bem conhecido que o NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina sob ação de três isoformas de NOS, sendo que duas são constitutivas, a eNOS e nNOS, e uma induzível frente a diferentes estímulos, a iNOS (para revisão ver Coleman, 2001). Sabe-se que a eNOS, principalmente na célula endotelial, é a responsável pela produção fisiológica de NO, que pode contar com auxílio de nNOS em alguns leitos vasculares (Casadei, 2006), e que a iNOS é a determinante em células inflamatórias (Saha & Pahan, 2006). Recentemente, mais uma isoforma de NOS, a NOS mitocondrial, tem sido descrita (Ghafourifar & Cadenas, 2005). O NO é um radical inorgânico de meia vida curta (3 a 5 segundos) que se difunde rapidamente dentro das células. Age como mediador biológico, similar aos neurotransmissores no sistema nervoso, regula o tônus vascular e é um importante agente envolvido na defesa do hospedeiro no sistema imune (para revisão ver Aktan, 2004).

Como o NO é um potente vasodilatador, seu envolvimento na resposta inflamatória está relacionado com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sangüíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Por outro lado o NO exerce várias importantes funções antinflamatórias, tais como a regulação da expressão de moléculas de adesão, prevenção da agregação plaquetária, (Salvemini e cols. 1996).

O processo inflamatório é complexo e envolve uma gama imensa de células e substâncias secretadas por estas, que atuam no sentido de eliminar o agente lesivo, sem dano para o hospedeiro. No entanto, modificações em eventos que regem o processo podem levar à ineficácia ou a exacerbação do quadro inflamatório. Em ambas as situações, o hospedeiro é prejudicado. Desta forma, conhecer moléculas que atuam especificamente em cada etapa do processo, além de interferir farmacologicamente sobre eventos específicos, tem sido um dos desafios da ciência contemporânea (Galli, 2008).

4. Apoptose

Apoptose é um tipo de "auto-destruição celular" que ocorre de forma ordenada, para manutenção do equilíbrio do organismo. Desta forma, possui papel relevante na fisiologia e na gênese de quadros fisiopatológicos induzidos por inúmeros agentes agressores.

É ativada por um conjunto de genes que codificam proteínas essenciais para a morte da célula, como endonucleases e proteases. A ativação pode envolver mecanismos moleculares, dependendo da supressão de fatores tróficos oriundos de células vizinhas, como fatores de crescimento, ou distantes, como hormônios (Robertis, 2001).

A apoptose é induzida no desenvolvimento embrionário, onde várias estruturas do feto sofrem involução ao longo do período gestacional; na menopausa, período no qual os tecidos endometrial e mamário sofrem atrofia devido à queda nos níveis séricos dos hormônios sexuais femininos, na renovação de células lábeis, isto é, em tecidos cujas células se renovam constantemente, como o epitélio que reveste a pele; nas resposta do organismo ao trauma, para que haja eliminação da superpopulação de leucócitos que foram usados na defesa do organismo, entre outras (Blankenberg, 2008).

Ademais, uma gama importante de agentes químicos, físicos e biológicos, podem interferir com os mecanismos de controle de apoptose, favorecendo ou inibindo a apoptose, levando ao desequilíbrio tecidual, com consequente gênese de doenças (Gewies, 2003).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela diminuição do tamanho celular, com agregação dos componentes celulares, o que deixa a célula bastante eosinofílica; o núcleo celular muda de aspecto, a cromatina se prende à carioteca e toma um aspecto mais denso, além da fragmentação do núcleo (cariorréxis); formam-se “bolhas” de citoplasma a partir da membrana plasmática celular, que se desprendem e formam corpos apoptóticos. Todas estas modificações levam a alterações de membrana que fazem com que as células apoptóticas sejam, agora, reconhecidos e fagocitados por células competentes.

Três mecanismos são de fato reconhecidos por estarem envolvidos no processo apoptótico: um deles mediado por receptor, uma via mitocondrial e um último no qual o retículo endoplasmático assume o papel central. Todos eles ativam caspases, que são responsáveis pelas modificações morfológicas observadas durante a apoptose (Van Cruchten, Van den Broeck, 2002).

Como descrito, a apoptose está envolvida em diversos eventos críticos que ocorrem durante o desenvolvimento normal como embriogênese, no desenvolvimento do sistema imunológico e na diferenciação celular, entre outros e pode ter um papel chave em uma variedade de doenças.

5. Formação de novos vasos

5.1. Células endoteliais progenitoras

Na década de 1960, pesquisadores descobriram que a medula óssea contém, pelo menos, dois tipos de células-tronco, a saber: 1) as hematopoiéticas, que formam todos os tipos de células sanguíneas; 2) as células do estroma e uma população mista, que pode dar origem a osso, cartilagem, gordura e tecido fibroso e conjuntivo.

Com respeito ao desenvolvimento das células sanguíneas e endoteliais, há evidências que ambas tem um precursor comum, conhecido como hemangioblasto, que se diferencia para formar células hematopoiéticas e angioblastos.

Angioblastos são células endoteliais primitivas que proliferam e se diferenciam formando o plexo vascular primário, que consiste em uma rede primitiva de vasos sanguíneos (Risau, 1997; Jain, 2003). Essa rede se modifica pela supressão e alargamento de vasos para formar uma vascularização madura, com ramificação e interconexão de vasos. Esse processo é conhecido como remodelação angiogênica.

A neovascularização também acontece pelo recrutamento de células semelhantes aos angioblastos, denominadas células progenitoras endoteliais da medula óssea, (EPCs) (Conway e cols, 2001).

Asahara e cols (1997) foram os primeiros a descrever a existência das células endoteliais progenitoras (EPCs), sua origem na medula óssea e sua participação na formação de novos vasos em adultos.

As EPCs podem formar novos vasos por três mecanismos:

- a) **Angiogênese:** crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares preexistentes. Seus processos de crescimento e remodelamento, que levam à evolução da rede vascular primitiva para uma rede mais complexa;
- b) **Arteriogênese:** consiste no crescimento de vasos colaterais. É um mecanismo capaz de preservar a estrutura e função de membros e de órgãos após a oclusão de grandes vasos;
- c) **Vasculogênese:** é a formação de vasos sangüíneos num tecido previamente avascular que ocorre principalmente no embrião. Adicionalmente, participa da vascularização de alguns tumores sólidos.

O plexo vascular primitivo no embrião se origina do mesoderma por vasculogênese. No indivíduo adulto, novos vasos surgem principalmente por angiogênese, embora a vasculogênese também possa ocorrer.

Há descrições que a arteriogênese é o mecanismo mais eficiente para aumento da rede circulatória, capaz de aumentar entre vinte a trinta vezes; a angiogênese aumenta duas a três vezes e o aumento provocado pela vasculogênese ainda não foi adequadamente dimensionado (Simons, 2005).

5.2. Angiogênese

O desenvolvimento e o funcionamento adequado dos tecidos dependem de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune. Esse suprimento é fornecido através dos vasos sanguíneos.

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (Folkman & Brem, 1992).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem em vários tecidos, assim, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido.

Embora as células endoteliais sejam o foco da atenção, elas sozinhas podem iniciar, mas não completar a angiogênese. As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento vascular, pois estabilizam o vaso recém-formado pela inibição da migração e da proliferação endotelial e por estimular a produção de matriz extracelular. Elas proporcionam controle homeostático e protegem o novo vaso contra rupturas ou regressão (Carmeliet, 2000).

A angiogênese inicia-se com a dilatação de vênulas preexistentes e aumento da permeabilidade vascular, principalmente em resposta ao óxido nítrico e VEGF. As vênulas podem sofrer brotamento, ou tornarem-se divididas por colunas de células periendothelias, processo denominado intussuscepção, ou por pontes de células transendothelias, as quais dividem o vaso em capilares distintos (Benjamin e cols, 1998; Carmeliet, 2000). Com isso, inicia-se a degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendothelias (Jain, 2003).

Figura 4: Esquema de formação de novos vasos. O processo inicia-se com a lise da membrana basal que circunda o vaso por proteases secretadas pelas células endoteliais. Depois ocorre a migração de células endoteliais circulantes para o sítio de formação do vaso, onde proliferam e formam uma espécie de broto. Além disso, ocorre uma nova proliferação e diferenciação das células endoteliais com conseqüente crescimento e formação da luz do novo vaso. Finalizando, ocorre a secreção de fatores de crescimento pelas células endoteliais que atraem células de suporte (pericitos e células musculares lisas), e formam a membrana basal. Tanto as células de suporte como a membrana basal são essenciais para o funcionamento e estabilidade do vaso formado. Nesse estágio final, os vasos adquirem características especializadas adequadas ao tecido ou órgão a que pertencem.

Em circunstâncias normais a formação de novos vasos sangüíneos ocorre durante a cicatrização de feridas; regeneração de tecidos; no sistema reprodutor feminino na maturação do folículo ovariano, na formação do corpo lúteo, na regeneração do endométrio após o ciclo menstrual, na implantação do ovo e na formação da placenta. A angiogênese também é um fator importante em vários processos patológicos, como no crescimento e metastase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, na psoríase, obesidade, aterosclerose, isquemia, osteoporose, e outras (Reynolds e cols, 1992; Folkman, 1995; Burke & DeNardo, 2001; Carmeliet, 2003; Hoebe e cols, 2004).

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle com fatores angiogênicos e anti-angiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto, o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorrerá quando esta relação for inversa. Vários componentes da matriz extracelular como a endostatina e fragmentos de colágeno tipo XVIII (matriz extracelular - MEC) e IV (membrana basal) são exemplos de fatores angiostáticos, vários componentes da matriz extracelular como endostatina. Os fatores pró-angiogênicos mais comuns são a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF- α), quimiocinas, angiogenina, células inflamatórias (D'amore & Thompson, 1987; Bernardini e cols, 2003).

Os fatores de crescimento são um conjunto de substâncias, a maioria de natureza protéica, que desempenham uma importante função na comunicação intercelular. Atuam unindo-se a receptores celulares situados na membrana celular que transmitem o sinal para o interior da célula. A função principal dos fatores de crescimento é o controle externo do ciclo celular, não somente estimulando a proliferação, mas também mantendo a sobrevivência celular, estimulando a migração e diferenciação.

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 34-46kDa produzida por vários tipos celulares em resposta a números estímulos. Ele age sobre as células endoteliais vasculares ligando-se a receptores específicos transmembrana. Essa ligação ativa várias vias sinalizadoras, cujas principais conseqüências são a proliferação e migração de células endoteliais vasculares; sobrevida de células endoteliais e maior permeabilidade vascular.

O VEGF foi inicialmente caracterizado por aumentar a permeabilidade vascular e promoção da proliferação de células endoteliais. Os receptores para esse fator de crescimento formam uma família de 3 membros (R1, R2 e R3). Dentre esses, o VEGFR2 é o principal receptor com capacidade de induzir a

proliferação de células endoteliais, bem como a migração e o auxílio na formação de novos vasos (Michiels, 2003).

Do exposto acima fica evidente que a formação de novos vasos é um processo de extrema importância para manutenção da integridade tecidual, além de ser fundamental em processos de reparo, transplantes de tecidos e formação de metástases em processos neoplásicos. Desta forma, as interferências neste processo têm sido amplamente investigadas como estratégias terapêuticas.

Objetivos

As caracterizações dos mecanismos de ação do LOPAP, e mais recentemente de sua fração peptídica P4, levaram a indicações de que estas moléculas podem exercer papel em diferentes processos fisiopatológicos. Desta forma, este trabalho de dissertação de mestrado utilizou modelos experimentais *in vivo*, *in situ* e *in vitro* para esclarecer os possíveis efeitos do LOPAP e do peptídeo 4 sobre a interação leucócito-endotélio e reatividade vascular *in vivo*; expressão de moléculas de adesão, secreção/produção de mediadores inflamatórios, morte celular em neutrófilos e célula endotelial; e formação de novos vasos.

Material e Métodos

3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-200g) e camundongos Swiss machos (20-25g). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Em anexo encontra-se a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-SP.

Todos os experimentos foram conduzidos em animais anestesiados pela solução de ketamina/xilazina (77,3mg/Kg de cloridrato de ketamina e 7,6mg/Kg de cloridrato de xilazina).

2. Obtenção do LOPAP e do P 4

O LOPAP recombinante e nativo foi obtido no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, sob responsabilidade da Dr^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi.

Em nossos ensaios utilizamos o rLOPAP – monodimérico de 21 kDa. O rLOPAP foi diluído em solução salina estéril e armazenado em freezer - 20°C.

É importante salientar que o rLOPAP reproduz os efeitos da proteína nativa na microcirculação, produzindo coágulos de fibrina que foram visualizados em vasos pós-capilares por até 48 horas após a injeção (intravenosa) de 125 a 500 µg/Kg de rLopap. Os camundongos apresentaram sangue incoagulável e fibrinogênio foi indetectável por 48 horas após o tratamento (Reis, comunicação pessoal).

O peptídeo 4 (P4) foi obtido a partir de seqüências de aminoácidos presentes na seqüência primária do LOPAP, com similaridade a domínios (motifs)

que caracterizam moléculas da família das lipocalinas. O processo de patente do peptídeo 4 está como provisional nos Estados Unidos e tem co-titularidade com a FAPESP.

3. Microscopia Intravital

A microscopia intravital é uma técnica utilizada para o estudo da dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos, pela observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não.

Para tanto, ratos Wistar sofreram incisão longitudinal na parede abdominal para exposição da rede microcirculatória do mesentério, segundo procedimento proposto por Baez, 1973. Em seguida, o leito mesentérico foi posicionado em uma placa de acrílico com temperatura controlada e o tecido foi mantido úmido pela irrigação de solução de Ringer-Locke (pH 7,2 – 7,4 – NaCl= 154mM/ KCl=5,6 mM/ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 2 mM/ NaHCO_3 = 6 mM e glicose= 5mM) contendo 1% de gelatina. No momento da aplicação tópica de LOPAP ou de P4 a perfusão foi suspensa. Após as quantificações, a perfusão foi retomada até que nova aplicação em outro campo fosse realizada. As imagens obtidas em microscópio óptico (Carl-Zeiss, AxioskopII) foram transmitidas por uma câmera de projeção de imagem (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), ligadas ao microscópio, para monitores de TV ou de computador. Os aumentos proporcionados pelas objetivas do microscópio, pelo optovar (sistema adicional de ampliação de imagem localizado no microscópio) e pela câmera de projeção de imagem conferem ampliação e nitidez suficiente para as análises quali e quantitativas nas telas dos monitores. Nestes estudos foram empregadas objetivas de 20x e optovar de 1.0. O computador possui um programa de análise de imagem (KS300, Carl-Zeiss) que permite análises quantitativas das imagens digitalizadas e o aparelho de TV está ligado a um aparelho de vídeo-cassete que permite a gravação das imagens continuamente.

3.1. Quantificação dos leucócitos “rollers” e aderidos em vênulas pós-capilares

Após os procedimentos cirúrgicos, o leito mesentérico ficou sob perfusão com solução de Ringer-Locke durante 20 minutos. Findo este período, vênulas pós-capilares com diâmetro entre 15 a 30 μm foram selecionadas e os números de leucócitos em comportamento “rolling” e aderidos à parede vascular foram quantificados por 10 minutos. Em seguida, LOPAP, P4 (ambos nas concentrações de 0,3; 3,0 ou 10,0 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) ou solução salina (controle) foram aplicadas (volume final de 10 μL) com auxílio de pipetas automáticas e as quantificações realizadas em três intervalos consecutivos de 10 minutos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m.

O número de leucócitos em comportamento “rolling” foi quantificado pelo número de células brancas “rollers” no vaso (extensão de 200 μm) em contato com a parede vascular no intervalo de 10 minutos. Leucócitos aderidos foram aqueles que permaneceram por mais de 1 minuto fixo à parede vascular durante o período de 10 minutos. As quantificações foram feitas nas imagens contínuas nas telas dos monitores.

3.2. Quantificação do diâmetro de vênulas pós-capilares

A mensuração do diâmetro dos vasos da microcirculação foi realizada antes e 10 minutos após a aplicação tópica de 0,3; 3,0 ou 10,0 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ das toxinas, usando as imagens digitalizadas e o programa de análise de imagem (KS300).

3.3. Avaliação da reatividade vascular

Para tanto, arteríolas com diâmetros de 20 a 30 μm foram selecionados e após período de estabilização, veículo ou LOPAP ou P4 nas concentrações de 3,0 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ foram aplicados topicamente. Após 10 minutos, solução de noradrenalina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi aplicada e o tempo mensurado até estase. Imediatamente após a estase, solução de acetilcolina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi aplicada sobre o vaso e o tempo para restabelecimento do fluxo sanguíneo foi quantificado. As imagens foram visualizadas em tela dos monitores de TV e do computador e analisadas no programa KS300.

4. Quantificação da expressão de moléculas de adesão: Citometria de fluxo

4.1. Em leucócitos circulantes

4.1.1. Obtenção de leucócitos circulantes

Leucócitos circulantes foram obtidos pela punção da aorta abdominal dos animais previamente anestesiados com solução de ketamina/xilazina (2:1). Em seguida, os eritrócitos foram lisados com solução de cloreto de amônia (0,13 M). A suspensão de células foi centrifugada por 15 minutos a 4°C em 1500 rpm. Após remoção do lisado de hemácias, mais duas lavagens subsequentes com solução tamponada de fosfatos (PBS) foram realizadas, seguidas de centrifugações (15 minutos a 4°C em 1500 rpm). As células brancas foram quantificadas em câmara de Neubauer e 1×10^6 foram ensaiadas para a expressão de moléculas de adesão L-selectina ou β_2 integrina.

4.1.2. Quantificação da expressão de L-selectina e $\beta 2$ integrina

Dois delineamentos experimentais foram realizados:

1) para quantificar o papel das toxinas sobre a expressão basal das moléculas de adesão. Neste caso, as células foram incubadas a 37°C por 15 ou 30 minutos com 3 $\mu\text{g/mL}$ de P4 para quantificação da expressão da L-selectina e $\beta 2$ integrina, respectivamente;

2) para quantificar o papel das toxinas sobre a expressão induzida pelo fMLP. Assim, as células foram incubadas com fMLP 10^{-9}M (formyl-Met-Leu-Phe) por 15 ou 30 minutos e em seguida as toxinas foram adicionadas como descrito no item 1.

Após incubação as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm em temperatura de 4°C. Os anticorpos monoclonais anti-L-selectina ou anti- $\beta 2$ integrinas (10 μL , diluição final 1:100, BD - Pharmingen) foram adicionados. Após incubação por 20 minutos, a 4 °C, sob ausência de luz. As células foram fixadas com a adição de p-formaldeído (2%). A quantificação da expressão das moléculas de adesão foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur flow cytometer, Ambriex). Foram analisados 10.000 eventos em cada amostra.

4.2. Em cultura primária de células endoteliais

4.2.1. Obtenção de culturas primárias de células endoteliais

A cultura de células endoteliais foi feita a partir do músculo cremaster dos ratos Wistar machos, seguindo a metodologia descrita por Chen e cols, 1995 e modificada por Lotufo e cols, 2006. Para tal procedimento, os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina e exsangüinados pela secção da artéria carótida e/ou jugular. Em seguida, incisão cirúrgica na bolsa escrotal foi realizada, em fluxo laminar, para remoção do músculo cremaster. O tecido foi

transferido para placas de culturas (24 poços) contendo 600µL de meio de cultura (DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco™) estéril, com 20% de soro fetal bovino (Fetal bovine serum - Gibco™) e 40 mg/L de gentamicina (Gentamicin Reagent Solution - Gibco™). A placa foi incubada por 48h em estufa de CO₂ (5%) em atmosfera úmida. Após este período, o tecido foi removido e 200µL de meio foi adicionado. A placa foi mantida em estufa até que as células atingissem confluência quantificada em microscópio invertido (Leica DMI 4000B), sendo que o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após cerca de 8-10 dias, as células foram repicadas em uma nova placa de 24 poços. Quando as células atingiram 90% de confluência (após 48 horas, aproximadamente) as células foram tratadas com as toxinas.

4.2.2. Quantificação da expressão de imunoglobulinas

Com o intuito de determinar os efeitos do LOPAP e do P4 sobre a expressão de ICAM-1, VCAM e PECAM pela célula endotelial. Findo este período, as células foram desprendidas com solução tripsina/EDTA (Cultilab) e o ensaio para quantificação da expressão das moléculas de adesão foi realizado da mesma forma que o descrito acima para a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos usando anticorpo monoclonal anti cada molécula.

Para quantificar o papel das toxinas sobre a expressão basal das moléculas de adesão a cultura primária de células foi incubadas a 37°C com DMEM + LPS (1µg/mL), LOPAP ou P4 (ambos 3 µg/mL – Volume final = 500µL) por 8 horas (para ICAM-1 e VCAM) ou 4 horas (para PECAM) por 4 horas (PECAM-1) ou 8 horas (ICAM-1 e VCAM-1) com 3 µg/mL de LOPAP ou P4. Após esse período as células foram retiradas da placa cultura com auxílio de um *cell scraper*, colocadas em tubos para citometria de fluxo e incubadas com os anticorpos específicos marcados com fluorescência.

Após incubação por 20 minutos a 4 °C, sob ausência de luz, as células foram fixadas com a adição de p-formaldeído (2%). A quantificação da expressão

das moléculas de adesão foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur flow cytometer, Ambriex). Foram analisados 10.000 eventos em cada amostra.

É importante citar que os tempos de incubação foram escolhidos a partir de uma curva de tempo-resposta. Para a determinação das moléculas de adesão utilizamos o tempo no qual o LPS foi capaz de melhor estimular o aumento na expressão dessas moléculas.

5. Quantificação de mediadores inflamatórios

5.1. Obtenção de neutrófilos

Os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina (2:1) e receberam injeção intraperitoneal de 10 mL de solução de glicogênio de ostra 1% (Type II – Sigma®). Após 4 horas, os animais foram re-anestesiados, exsangüinados pela secção da artéria carótida e veia jugular e a cavidade abdominal foi exposta para coleta das células com auxílio de pipeta Pasteur de plástico e solução de PBS. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada por 15 minutos, a 4°C, em 2000 rpm. As células foram ressuspensas em 1mL de PBS estéril e contadas em câmara de Neubauer.

Foram transferidas 1×10^6 células para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços e o volume de cada poço foi ajustado para 500µL, utilizando meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco™). As células foram tratadas com 3µg/mL de P4 por 18 horas, mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂. Findo este período, os sobrenadantes foram coletados para quantificar citocinas e óxido nítrico. Os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até o momento dos ensaios de Elisa ou reação de Griess.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão de trypan blue após a coleta do sobrenadante.

5.2. Obtenção de célula endotelial

Foram empregadas culturas primárias de célula endotelial obtidas conforme descrito no item 4.2.1.

5.3. Dosagem de citocinas

O sobrenadante foi retirado da placa de cultura de neutrófilos ou de célula endotelial foi coletado após tratamento de 18 horas com LOPAP, P4 (ambos 3µg/mL) ou LPS (1µg/mL). Foram quantificadas as concentrações de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e o fator de necrose tumoral (TNF-α) seguindo as descrições do “kit” comercial referente a cada citocina.

As citocinas foram quantificadas no sobrenadante da cultura de neutrófilos utilizando a técnica de Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Os protocolos de ensaios podem ser conferidos no site da BD Biosciences, <http://www.bdbiosciences.com>, pelos respectivos números de catálogo para TNF-α (558870), IL-6 (550319) e IL-10 (555134).

5.4. Determinação da concentração de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pela reação de Griess, que detecta o nitrito presente na amostra. O nitrito, em meio ácido, reage com uma amina aromática (ácido p-arsanílico ou sulfanilamida), produzindo um sal de diazônio. Este sal reage com a 3-hidroxi-1,2,3,4-tetraidrobenzil quinolina formando um complexo de coloração rósea.

Em resumo, 100µL dos sobrenadantes das culturas celulares foram adicionados a 100µL do reagente de Griess contendo 1% de sulfanilamida com 0,1% de α-naftil etilenodiamina. Após 10 minutos de incubação à temperatura

ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

6. Avaliação da apoptose e necrose

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular, culturas de células endoteliais primárias e de leucócitos circulantes foram preparadas como descrito anteriormente nos itens 4.1 e 4.2. As células foram tratadas com o LOPAP ou com P4 por período de 24h em meio DMEM acrescido de 1, 10 ou 20% de soro fetal bovino. A carência de fatores importantes para o crescimento celular em meio de cultura tem sido uma estratégia experimental utilizada para induzir morte celular (Fritzen, 2005).

Após o período de incubação, foi acrescentado 90 μL de tampão de anexina e as células foram retiradas das placas de cultura com auxílio de um *cell scraper* e transferidas para tubos específicos para o ensaios de citometria de fluxo. Acrescentou-se então 10 μL (1:10) de anticorpo anti-anexina V (proteína ligada ao FITC) e incubou-se por 20 minutos na geladeira, protegido da luz.

Com o objetivo de se investigar o papel do NO na prevenção da apoptose provocada pelo LOPAP ou P4, leucócitos e/ou células endoteliais em cultura foram incubados com 1M de L-NAME, um bloqueador da síntese de NO, simultaneamente com LOPAP ou P4. As células foram mantidas em cultura pelo tempo de 24 horas e seguiu-se o protocolo do ensaio de apoptose como descrito anteriormente.

A necrose das células é quantificada pela da ligação direta de um marcador específico (fluorocromo) a moléculas estruturais ou funcionais. O iodeto de propídeo (PI), em princípio, não penetra a membrana citoplasmática de uma célula viva. Este fato reflete portanto uma integridade da membrana. Quando o PI cora

intensamente o núcleo da célula, é porque a célula perdeu a integridade da sua membrana periférica ou seja está morta.

Neste mesmo ensaio foi avaliado o processo de necrose pela adição de 4µL de iodeto de propídio (PI) por tubo (50µg/mL) no momento da leitura no citometro de fluxo.

7. Quantificação do número de vasos na rede microcirculatória in vivo

O número de vasos no tecido subcutâneo dorsal de camundongos Swiss, machos, foi avaliado usando o modelo de implantação de câmaras dorsais. Para tanto, o tecido dorsal foi depilado com creme depilatório (Veet®) e manipulações cirúrgicas na pele foram realizadas para implantação das câmaras dorsais (Institute for Surgycal Research, University of Munich, Germany) no tecido subcutâneo dorsal conforme descrito por Harder e cols, 2004. As fotos que mostram a seqüência do procedimento cirúrgico estão apresentadas na Figura 1.

Figura 5: Implantação da câmara dorsal em camundongos Swiss. O procedimento inicia-se com a depilação do animal utilizando creme depilatório. Após 10 minutos o creme é retirado e a pele recém depilada é presa por fios de sutura para permanecer completamente esticada. Inicialmente a placa traseira da câmara é inserida. Os parafusos da câmara são passados pela pele do camundongo, com auxílio de uma lâmina. A camada frontal da pele é retirada, na região onde ficará o visor de vidro da câmara. Com a retirada da parte frontal de pele é possível a perfeita visualização da microcirculação. A câmara é presa por pontos de fio de sutura em sua parte superior. As imagens foram capturadas tanto por câmara digital (Sony – Cyber-shot – 7.2 Mega pixels/Optical 3x) quanto por microscópio óptico (Carl-Zeiss, AxioskopII).

Após período de estabilização de 72 horas, as imagens da rede microcirculatória foram adquiridas usando câmeras digitais ou pelo equipamento de microscopia intravital (aumento 2.5x, optovar 1.0x) e iniciaram-se os tratamentos conforme apresentado na tabela abaixo. Para aplicação tópica do P4 ou de solução salina (volume final de 10 μ L), os animais foram anestesiados e a câmara dorsal retirada unilateralmente. Este procedimento é baseado no descrito por Harder e cols, 2004. As imagens foram observadas no primeiro, quinto e décimo dia após o início das aplicações.

Outro delineamento experimental envolveu o estudo da ação do P4 associada a aplicação de ECGS (Endothelial cell growth supplement - Sigma®) que consiste em um suplemento de fatores de crescimento que é indutor da proliferação de vasos. Para tanto, implantamos a câmara dorsal como já descrito e após 2 aplicações de P4, 100 μ g de ECGS foi aplicado topicamente. O esquema do tratamento está descrito no quadro abaixo:

Delineamento experimental:

Grupos 1 e 2: Efeito do Lopap ou P4 sobre o número de vasos na microcirculação

Grupos 3 e 4: Efeitos do P4 sobre a formação de novos vasos induzida por fator de crescimento

Quadro 2: Delineamento experimental dos grupos de camundongos tratados com LOPAP, P4 e/ou ECGS.

8. Avaliação da migração da célula endotelial

Com a finalidade de verificar a interferência do LOPAP e do P4 na capacidade de migração celular, foi utilizada cultura de células endoteliais de camundongos provenientes de linhagem (T end).

Para tanto, células foram cultivadas no meio RPMI contendo 10% de SFB. As células foram transferidas para uma garrafa de 25cm² e mantidas em estufa a 37°C. Após 48 horas, as células passaram pela primeira tripsinização e foram colocadas em cultura em uma garrafa de 75cm² nas mesmas condições de meio e soro. Após 48 horas, as células foram repicadas (segunda tripsinização) em placas de 24 *wells*, contendo 3x10⁴ células por *well*.

Vinte e quatro horas após a segunda tripsinização, as células foram tratadas com 3,0µg/mL de LOPAP ou P4. Uma lesão na monocamada celular foi realizada utilizando a ponta de uma ponteira. As células migradas para esta área lesada foram observadas e fotografadas por um período de 4 horas.

9. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados estatisticamente pelo Teste "t" de *student* ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário.

Resultados

1. Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a rede microcirculatória.

Ensaio de microscopia intravital *in situ* foram realizados com o intuito de investigar os efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre os fenômenos de interação leucócito endotélio e reatividade da rede microvascular mesentérica.

Os dados obtidos mostraram que a aplicação das doses de 30µg/mL, 300µg/mL ou 1000µg/mL (volume final igual a 10µL) do P4 ou do LOPAP não modificaram o diâmetro de vênulas pós-capilares. Os valores obtidos foram equivalentes antes e até 30 minutos após a aplicação do P4 ou LOPAP (3 medidas a cada 10 minutos após aplicação) (Figura 6).

Os resultados apresentados nas Figuras 7, 8 e 9 mostram os efeitos da aplicação tópica do LOPAP ou P4 sobre a interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares do leito mesentérico. A aplicação tópica de 30µg/mL (Figura 7) ou de 300µg/mL (Figura 8) do LOPAP ou P4 não alterou o número de leucócitos em comportamento “rolling” ou de aderidos à parede vascular. Por outro lado, a aplicação da concentração de ou 1000µg/mL não reduziu o número de leucócitos em comportamento “rolling”, mas aumentou significativamente o número de leucócitos aderidos à parede vascular (Figura 9). Estas modificações foram acompanhadas de estases intermitentes em vênulas pós-capilares.

É importante salientar que em animais controle, os diâmetros de vênulas pós-capilares e os números de leucócitos “rollers” ou aderidos à parede vascular em condições basais ou após a aplicação tópica do veículo (10µL de salina estéril) foram equivalentes.

A interferência do LOPAP ou P4 sobre a reatividade vascular foi avaliada frente a agentes vasoativos. A aplicação prévia de 300µg/mL LOPAP ou P4 sobre os vasos da microcirculação não modificou a resposta vascular a NOR ou Ach. Os tempos de latência para vasoconstrição causada pela NOR e subsequente dilatação pela ação da Ach foi similar em animais previamente tratados com LOPAP ou P4 ou salina estéril. (Figura 10).

Figura 6. Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre o diâmetro de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos. As barras brancas e as hachuradas representam os valores obtidos antes e após a aplicação das diferentes concentrações das toxinas, respectivamente. As quantificações foram realizadas em intervalos de 10 min e os valores indicam a média de três determinações (30 min). Os resultados expressam a média de $\pm$ epm de 6 animais.

Figura 7. Efeitos da aplicação tópica de 30µg/mL de LOPAP ou de P4 sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos. As barras brancas e as hachuradas representam os valores obtidos antes e após a aplicação das toxinas, respectivamente. As quantificações foram realizadas em intervalos de 10 min. Os valores obtidos após a aplicação da toxina indicam a média de 3 intervalos de 10 min (período final de 30 min). Os resultados expressam a média $\pm$ epm de 6 animais.

Figura 8. Efeitos da aplicação tópica de 300µg/mL de LOPAP (A) e de P4 (B) sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos. As barras brancas e as hachuradas representam os valores obtidos antes e após a aplicação da toxina, respectivamente. As quantificações foram realizadas em intervalos de 10 min. Os valores obtidos após a aplicação da toxina são a média de 3 intervalos de 10 min (período final de 30 min). Os resultados expressam a média $\pm$ epm de 6 animais.

Figura 9: Efeitos da aplicação tópica de 1000µg/mL de LOPAP e de P4 sobre a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos Wistar machos. As barras brancas e as hachuradas representam os valores obtidos antes e após a aplicação da toxina, respectivamente. As quantificações foram realizadas em intervalos de 10 min. Os valores obtidos após a aplicação da toxina indicam a média de 3 intervalos de 10 min (período final de 30 min). Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 6 animais.***P<0,001 em relação ao valor encontrado antes da aplicação das toxinas.

Figura 10: Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a reatividade vascular do leito mesentérico de ratos Wistar machos. Os resultados indicam o tempo necessário para parada de fluxo arteriolar após aplicação tópica 10 μ L de NOR (5 μ g/mL) e de seu restabelecimento após aplicação de 10 μ L de Ach. (300 μ g/mL). As aplicações dos agentes vasoativos foram realizadas 10 min após aplicação tópica de 300 μ g/mL de LOPAP, P4 ou salina. Os valores representam a média $\pm$ epm de 6 determinações em cada grupo.

2. Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio

2.1. Efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão em leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes

Os efeitos de LOPAP e do P4 sobre as expressões de L-selectina ou β_2 -integrina foram quantificados em PMN em condições basais e após estímulo com fMLP (10^{-9} M). As células foram tratadas *in vitro* com 3,0 μ g/mL tanto de P4 quanto de LOPAP, incubadas nos tempos pré-determinados e as quantificações foram realizadas em citometro de fluxo.

Os resultados obtidos mostraram que o LOPAP ou P4 não alteram a expressão basal de L-selectina em PMN, nem reduzem a elevada expressão induzida pelo fMLP (Figura 11). A expressão de β_2 -integrina também não foi alterada após tratamento com LOPAP ou P4 na presença ou ausência do fMLP (Figura 12).

Figura 11: Efeitos do LOPAP e P4 sobre a expressão de L-selectina em PMNs circulantes. Os PMNs foram coletados da aorta abdominal de ratos Wistar incubados *in vitro* com 3µg/mL das toxinas por 15 minutos em condições basais ou após prévia incubação com fMLP (10^{-9} M). Os dados obtidos em ensaios de citometria de fluxo expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 4 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *P<0,05 em relação aos respectivos valores obtidos em células incubadas com salina ou com LOPAP.

Figura 12. Efeitos do LOPAP e P4 sobre a expressão de β_2 -integrina em PMNs circulantes. Os PMNs foram coletados da aorta abdominal de ratos Wistar incubados *in vitro* com 3 μ g/mL das toxinas por 15 minutos em condições basais ou após prévia incubação com fMLP (10^{-9} M). Os dados obtidos em ensaios de citometria de fluxo expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 4 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *P<0,05 em relação aos respectivos valores basais.

2.2. Efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão em célula endotelial em cultura

A caracterização das células endoteliais foi realizada pela marcação das células em cultura com o anticorpo para PECAM-1. Após 2 horas da incubação com o anticorpo a análise foi realizada em microscopia confocal (Figura 13).

A quantificação de moléculas de adesão no endotélio foi realizada em cultura primária por citometria de fluxo. Para essa quantificação delineamos uma curva de tempo para quantificar cada molécula de adesão separadamente. O LPS foi testado em três diferentes concentrações (1, 2 e 5,0µg/mL), e não foi observada diferença significativamente entre as doses. Os melhores tempos de tratamento foram utilizados, sendo 8 horas para a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 e 4 horas para PECAM-1.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que a expressão de ICAM-1 foi significativamente aumentada após os tratamentos com LOPAP e P4 em relação às células tratadas com salina. Na Figura 15 é possível observar que a expressão de VCAM-1 foi alterada somente quando as células foram tratadas com P4, sendo que células estimuladas com LOPAP mantiveram os níveis de expressão de VCAM-1 semelhante aos valores das células que receberam apenas salina. Já a expressão de PECAM-1 não foi alterada nos tratamentos com LOPAP, P4 ou salina (Figura 16).

Figura 13. Foto da caracterização de células endoteliais em microscopia confocal pela marcação com PECAM-1. As células foram mantidas em cultura em placas próprias para microscopia confocal. As imagens foram capturadas diretamente no microscópio confocal, usando anticorpo monoclonal anti-PECAM-1 marcado com PE, e visualizadas com o programa de imagens LSM. Os ensaios foram realizados em triplicatas e foram quantificadas pelo menos 9 células m cada placa.

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem desta figura)

Figura 14: Efeitos do LOPAP e do P4 na expressão de ICAM-1 em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster. As células foram incubadas somente com meio DMEM, LPS LOPAP ou P4 por 8 horas. A análise foi realizada em citometria de fluxo usando anticorpo monoclonal anti ICAM-1 marcado com FITC. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicata. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ em relação aos respectivos valores obtidos em células incubadas com DMEM.

Figura 15: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a expressão de VCAM em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster. As células foram incubadas somente com meio DMEM, LPS, LOPAP ou P4 por 8 horas. Em seguida as células foram desprendidas das placas de cultura e analisadas em citometria de fluxo usando anticorpo monoclonal anti VCAM marcado com PE. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicata. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ em relação aos respectivos valores obtidos em células incubadas com DMEM.

Figura 16: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a expressão de PECAM em célula endotelial em cultura obtida a partir do músculo cremaster. As células foram incubadas somente com meio DMEM, LPS, LOPAP ou P4 por 4 horas. Em seguida as células foram desprendidas das placas de cultura e analisadas em citometria de fluxo usando anticorpo monoclonal anti-PECAM marcado com PE. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicata. * $P < 0.05$ em relação aos respectivos valores obtidos em células incubadas com DMEM.

3. Efeitos da aplicação do LOPAP e do P4 sobre a liberação de mediadores inflamatórios

3.1. Da célula endotelial

Culturas primárias de célula endotelial obtida da rede microvascular do músculo cremaster foram incubadas com LOPAP (3,0µg/mL) ou P4 (3,0µg/mL) por 18 horas e o sobrenadante coletado para quantificar mediadores inflamatórios. Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que células endoteliais tratadas, tanto com LOPAP quanto com P4, produziram uma quantidade significativamente maior de IL-6 e IL-10 quando comparadas com células tratadas com salina. Por outro lado as células não tiveram um aumento significativo na síntese de TNF-α.

É importante salientar que realizamos uma curva para determinar os tempos de tratamento para cada citocina quantificada. Os resultados obtidos mostram que a incubação por 18 horas foi mais eficiente.

3.2. De neutrófilos

Neutrófilos foram coletados da cavidade abdominal 4 horas após a injeção de glicogênio de ostra, quantificados e 1×10^6 neutrófilos foram incubados com 3,0 µg/mL de LOPAP ou de P4.

Os dados apresentados na Figura 18 mostram que a incubação de neutrófilos com 3,0 µg/mL de P4 provocou aumento significativo na concentração de óxido nítrico após 18 horas de incubação em relação à células tratadas com salina. Como controle positivo do ensaio foi quantificado a concentração de óxido nítrico em células incubadas pelo mesmo período com LPS (1ug/mL). Os resultados obtidos mostraram que a produção de NO pelas células incubadas com LPS foi significativamente maior que a observada em células tratadas com LOPAP, P4 ou salina.

As concentrações das citocinas IL-6 ou TNF- α no sobrenadante de neutrófilos incubados com LOPAP ou P4 (18 horas; 3,0 μ g/mL) não foram diferentes da obtida em células tratadas com salina (Figura 18). Como já salientado, em todos os ensaios, foi quantificada a concentração das citocinas em células estimuladas pelo LPS (controle positivo). O tratamento com LPS aumentou significativamente a concentração das citocinas em relação aos tratamentos com salina, LOPAP ou P4.

É importante ressaltar que a viabilidade dos neutrófilos foi avaliada por Trypan Blue após as 18 horas de incubações em todos os ensaios. Não foi observada viabilidade menor que 95%.

Figura 17: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a secreção de IL-6, IL-10 e TNF- α pela célula endotelial em cultura. As células primárias foram obtidas do músculo cremaster de ratos e incubadas com LPS (1 μ g/mL), LOPAP ou P4 (3,0 μ g/mL) por 18 horas. Os sobrenadantes foram coletados e a quantificação foi avaliada por ELISA. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células coletadas de 4 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. ***P<0,001 e **P<0,01 em relação ao respectivo valor encontrado em células incubadas com salina.

Figura 18: Efeitos do LOPAP e do P4 sobre a produção de NO e citocinas IL-6, ou TNF- α por neutrófilos. Os neutrófilos foram coletados da aorta abdominal de ratos Wistar e incubados *in vitro* com salina, LOPAP ou P4 (3,0 μ g/mL) ou LPS (1 μ g/1mL) por 18 horas. A quantificação de NO foi realizada por reação Greiss. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de sobrenadantes coletas de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. ** P<0,01 e *P<0,05 em relação aos valores em células tratadas com salina, LOPAP ou P4.

4. Efeitos da aplicação do LOPAP e do P4 sobre a apoptose de células endoteliais e neutrófilos

Para avaliar o efeito citoprotetor do LOPAP sobre a apoptose em HUVEC anteriormente descrito por Fritzen e cols (2005), células endoteliais e neutrófilos foram incubados com DMEM contendo apenas 1% de SFB para induzir o processo de apoptose. Simultaneamente, algumas células receberam 3,0µg/mL de LOPAP ou P4.

Os resultados apresentados nas Figuras 19 e 20 mostram que o número de células viáveis foi maior em culturas tratadas com LOPAP ou P4 que a observada em culturas tratadas com salina.

Figura 19: Quantificação da viabilidade de neutrófilos mantidos em cultura por 24 horas, incubadas com salina ou com 3,0µg/mL de LOPAP ou do P4. As culturas celulares foram mantidas com 10% de SFB (A) ou com 1% de SFB (B) para indução do processo de apoptose celular. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *** $P < 0,001$ em relação aos valores em células tratadas com salina.

Figura 20: Quantificação da viabilidade de células endoteliais mantidas em cultura por 24 horas, incubadas com salina ou com 3,0µg/mL de LOPAP ou do P4. As culturas celulares foram mantidas com 20% de SFB (A) ou com 1% de SFB (B) para indução do processo de apoptose celular. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *** $P < 0,001$ em relação aos valores em células tratadas com salina.

5) Efeitos do L-NAME sobre a produção de NO e a proteção à morte celular induzidas pelo LOPAP e P4

Com a finalidade de quantificar o processo de apoptose celular na ausência de NO, células endoteliais e neutrófilos foram mantidos em cultura como anteriormente descrito e tratados com 3,0µg/mL de LOPAP ou P4 e simultaneamente incubadas com L-NAME (1M).

Os dados apresentados na figura 21 mostram que o tratamento com L-NAME não reduziu a produção basal de NO uma vez que as concentrações em células tratadas com salina ou L-NAME foram equivalentes.

A incubação com LOPAP ou P4 aumentou significativamente a produção de NO. O tratamento simultâneo com L-NAME reverteu o aumento na produção de NO provocado pelas toxinas.

Os ensaios relacionados à viabilidade celular mostraram que o tratamento com L-NAME reduz o número de células viáveis em relação às células tratadas com salina; que o número de células viáveis em culturas tratadas com LOPAP ou L-NAME é significativamente maior que a observada em células tratadas com salina; e que o número de células viáveis em culturas tratadas com LOPAP ou P4 simultaneamente ao L-NAME não difere das células tratadas com salina.

O padrão de resposta aos tratamentos em culturas de células endoteliais foram semelhantes às observadas em culturas de neutrófilos, no entanto o número de células viáveis e culturas tratadas simultaneamente com L-NAME e LOPAP ou L-NAME e P4 foram maiores que as células tratadas com salina ou L-NAME (figura 23)

Figura 21: Efeito do L-NAME na síntese de NO por neutrófilos. As culturas de neutrófilos foram incubadas com salina, L-NAME, LOPAP ou P4, L-NAME e LOPAP ou L-NAME e P4 simultaneamente por 24 horas. A quantificação de NO foi realizada pela Reação de Griess. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *** $P < 0,001$ em relação aos valores em células basais. # $P < 0,001$ em relação às células tratadas com L-NAME.

Figura 22: Efeito do L-NAME no processo de apoptose de neutrófilos. Os neutrófilos foram incubados com salina, L-NAME (1M), LOPAP, P4, LOPAP+L-NAME ou P4+L-NAME por 24 horas em meio carenciado (1%SFB). A viabilidade celular foi mensurada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *** $P < 0,001$ em relação aos valores em células tratadas com salina, L-NAME, LOPAP+L-NAME e P4+L-NAME. e # $P < 0,001$ em relação à células tratadas com L-NAME.

Figura 23: Efeito do L-NAME no processo de apoptose de células endoteliais. As células foram incubados com salina, L-NAME (1M), LOPAP, P4, LOPAP+L-NAME ou P4+L-NAME por 24 horas em meio carenciado (1%SFB). A viabilidade celular foi mensurada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de células de 3 animais. Os ensaios foram realizados em duplicatas. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ em relação aos valores em células tratadas com salina. ** $P < 0,01$ em relação às células tratadas com LOPAP e P4 e # $P < 0,001$ em relação à células tratadas com L-NAME.

6) Efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre o número de vasos na rede microcirculatória dorsal de camundongos

O modelo de câmara dorsal foi empregado para avaliar se LOPAP e P4 alteram a conformação e/ou formação de vasos na microcirculação. Para tanto, LOPAP ou P4 foram aplicados em 3 doses (30µg/mL ou 300µg/mL, volume final de 10µL cada dose) a cada 96 horas e o número de vasos foi quantificado por análise de imagem. As fotos apresentadas na Figura 24 mostram a rede microcirculatória antes e nos 5º e 10º dia após o início dos tratamentos com salina e LOPAP. Já na Figura 25 as fotos apresentadas são relativas ao tratamento com as mesmas concentrações de LOPAP.

As imagens obtidas mostram que tanto a aplicação tópica de LOPAP como de P4 alterou a formação microvascular, representada pela redução destes vasos em comparação à rede microvascular em animais tratados com salina.

Doses superiores a 300µg/mL de LOPAP ou P4 desencadearam efeitos semelhantes às doses utilizadas (Dados não mostrados).

Salina

LOPAP – 30 μ g/mL

LOPAP – 300 μ g/mL

Figura 24: Efeito da aplicação tópica de LOPAP sobre os vasos da microcirculação dorsal de camundongos. As imagens foram capturadas antes e nos 5º e 10º dia após o início da administração tópica de salina ou LOPAP. As imagens foram analisadas pelo programa KS300 e os valores que expressam a diminuição dos vasos estão representados nos gráficos correspondentes. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em relação aos valores encontrados antes da aplicação do LOPAP ou salina.

P4 - 30 μ g/mL

P4 - 300 μ g/mL

Figura 25: Efeito da aplicação tópica de P4 sobre os vasos da microcirculação dorsal de camundongos. As imagens foram capturadas antes e nos 5^o e 10^o dia após o início da administração tópica de salina ou P4. As imagens foram analisadas pelo programa KS300 e os valores que expressam a diminuição dos vasos estão representados nos gráficos correspondentes. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *P<0,05 e **P<0,01 em relação aos valores encontrados antes da aplicação do P4.

7) Efeitos da aplicação tópica do P4 sobre a formação de novos vasos na rede microcirculatória dorsal de camundongos induzida por fator de crescimento

Na Figura 26 podemos demonstrar que a aplicação tópica de 100µg de ECGS nos vasos da microcirculação dos camundongos causou aumento significativo no número de vasos após 72 horas.

A aplicação do fator de crescimento no 7º dia de tratamento com o P4 não acarretou aumento significativo no número de vasos na rede microcirculatória. O número de vasos foi semelhante na rede microcirculatória antes do início do tratamento e após a aplicação do fator de crescimento.

Aplicação de P4 + ECGS

Figura 26: Efeito do P4 sobre a formação de novos vasos provocada por fator de crescimento. O ECGS (100µg/10µL) foi aplicado topicamente e as imagens foram capturadas após 72 horas. Foram aplicadas 2 doses de P4 (300µg/mL) com intervalo de 96 horas e o ECGS foi aplicado após 48 horas. As imagens foram capturadas após 72 horas. As imagens A e B mostram a rede microcirculatória antes e após a aplicação do ECGS, respectivamente. A figura D mostra a rede microcirculatória antes da aplicação do P4; a figura E mostra a imagem da rede microcirculatória após aplicação do P4 e a figura F após aplicação do ECGS. As figuras C e G mostram a quantificação das imagens obtidas de 3 animais em cada grupo.

8) Efeitos do tratamento in vitro de LOPAP e P4 sobre a migração de células endoteliais

Células endoteliais em cultura (tEnd) foram utilizadas para se avaliar o efeito do LOPAP e do P4 sobre a capacidade de migração. Os resultados obtidos apresentados na Figura 27 mostram que as toxinas inibem a capacidade de migração dessas células.

O número de células que migraram, após 4 horas de tratamento, na monocamada de cultura tratadas com LOPAP ou P4 foi menor que o observado em culturas tratadas com salina.

Salina

Antes

Após 4 horas

LOPAP - 3,0 μ g/mL

Antes

Após 4 horas

P4 - 3,0 μ g/mL

Antes

Após 4 horas

Figura 27: Efeito da aplicação de LOPAP ou P4 sobre a migração de células endoteliais de camundongo. As fotos foram obtidas antes e 4 horas após o início do tratamento com salina, LOPAP e P4. O gráfico representa a média $\pm$ e.p.m. de 3 placas de células. *** $P < 0,001$ em relação à células tratadas com salina.

Discussão

Os resultados de ensaios experimentais obtidos com o LOPAP têm fornecido dados para sua caracterização como uma molécula importante no quadro fisiopatológico do envenenamento por lagartas *Lonomia obliqua*, além de fornecer dados para seu possível emprego como ferramenta científica. Recentemente, quatro peptídeos foram desenhados a partir do LOPAP no sentido de conhecer as estruturas responsáveis pelos efeitos celulares e sobre a cascata da coagulação do LOPAP. Dentre estes peptídeos, o denominado P4, tem apresentado dados interessantes, uma vez que não altera a cascata da coagulação, apresenta efeito anti-apoptótico em célula endotelial e estimula a síntese de moléculas de matriz extracelular *in vivo* e *in vitro*, aumentando a síntese de pró-colágeno, fibronectina, elastina e tensina (Chudzinski-Tavassi, comunicação pessoal).

Desta forma, os estudos aqui propostos tiveram o objetivo de caracterizar os efeitos do LOPAP e do P4 sobre célula endotelial, neutrófilos e a rede microcirculatória para complementar a caracterização dos efeitos destas toxinas.

A literatura tem mostrado que serinoproteases, especialmente aquelas envolvidas na ativação da cascata da coagulação, como fator X e trombina, interagem com receptores ativados por proteases ("protease-activated receptors", PARs) e induzem atividades inflamatórias, entre as quais a locomoção de leucócitos, a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e célula endotelial (Roemisch e cols., 2002; Pandya e cols., 2008; Shpacovitch e cols., 2008).

Assim, inicialmente estudamos os efeitos da aplicação tópica do LOPAP e do P4 sobre as interações dos leucócitos circulantes ao endotélio dos vasos da microcirculação, predominantemente em vênulas pós-capilares. Foram empregadas três concentrações de ambas as toxinas, com base nos estudos de citotoxicidade realizados pelo grupo da Dra Ana Marisa Chudzinski-Tavassi (dados

não mostrados). Os resultados obtidos mostraram que a aplicação tópica do P4 ou do LOPAP não alterou o diâmetro destas vênulas e que somente a concentração de 1000µg/mL causou modificações na interação leucócito-endotélio, visualizado pela manutenção do número de leucócitos em comportamento “rolling” e aumento marcado de células aderidas ao endotélio microvascular. É possível que estas alterações sejam dependentes de modificações no fluxo sanguíneo, uma vez que foram observadas estases intermitentes em vênulas pós-capilares. Neste contexto, é importante ressaltar que os ensaios de microscopia intravital mostram os efeitos que ocorrem no leito microvascular, integrando os efeitos sobre as células do sangue, da parede vascular e de componentes do plasma (para revisão ver Raud & Lindborn, 1994; Matheson & Garrison, 2005), o que fornece vantagens em relação a ensaios *in vitro* para o mesmo fim. Desta forma, as alterações na cascata da coagulação a conseqüente redução do fluxo sanguíneo podem ter contribuído para as interações dos leucócitos circulantes e endotélio microvascular. Estas observações são reforçadas por dados da literatura, que mostram alterações na interação leucócito-endotélio durante ativação da cascata da coagulação (Esmon, 2004; Gando e cols, 2005; Musashi e cols, 2005).

Adicionalmente, os dados aqui obtidos mostraram que as toxinas não alteram a reatividade da microcirculação frente a agentes vasoativos. Foram testadas a capacidade do LOPAP ou P4 interferir com a capacidade de contração arteriolar pela Nor e a dilatação pela Ach. Esta estratégia experimental é empregada cientificamente para caracterização da gênese de doenças e para identificar ações vasoativas de novas moléculas (Akamine e cols, 2003; Zakaria e cols, 2004; Macedo e cols, 2006).

Em conjunto, os resultados obtidos em ensaios de microscopia intravital mostraram que as toxinas não induzem a interação leucócito-endotélio *in vivo*, nem modificam a reatividade vascular.

Dados prévios com o LOPAP mostram sua capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão e a secreção/produção de mediadores inflamatórios por HUVEC (Chudzinski-Tavassi e cols, 2001; Fritzen e cols, 2005). Desta forma, investigamos os efeitos da toxina isoladamente em neutrófilos e em célula endotelial de microcirculação de ratos. Foram empregados leucócitos circulantes obtidos da aorta abdominal dos animais e cultura primária de célula endotelial obtida dos vasos da microcirculação do músculo cremaster de ratos. Este último tipo celular foi escolhido porque existem diferenças quanto à morfologia e atividades bioquímicas e funcionais de células endoteliais provenientes de vasos de grande e pequeno calibre (Armstrong e cols, 2004; Dejana e cols, 2008). As células endoteliais foram caracterizadas pela marcação com anticorpo monoclonal anti-PECAM-1 por microscopia confocal de acordo com o apresentado por Lotufo e cols. (2006). A PECAM-1 é uma molécula de adesão constitutiva da célula endotelial e não expressa em fibroblastos ou em célula de músculo liso, células que possivelmente poderiam crescer concomitantemente com o endotélio (Woodfin e cols, 2007; Garrido-Urbani e cols, 2008).

Os dados apresentados mostram que o LOPAP e o P4 não alteram a expressão de L-selectina e β_2 -integrina, moléculas expressas em leucócitos e responsáveis pelo “rolling” e adesão, respectivamente. Por outro lado, o tratamento de células endoteliais pelo LOPAP ou P4 induziu aumento na expressão de ICAM-1, corroborando o efeito do LOPAP em células provenientes de vasos de grande calibre (HUVEC) (Chudzinski-Tavassi e cols, 2001; Fritzen e cols, 2005). Adicionalmente, o tratamento com P4 também provocou expressão de VCAM-1.

Estes dados reforçam a hipótese que as toxinas das cerdas da lagarta *L. obliqua*, tanto o LOPAP como o P4, atuam sobre a célula endotelial, estimulando a expressão dessas moléculas e corroboram os resultados do tratamento com LOPAP sobre HUVECs (Fritzen e cols, 2005). Os significados biológicos destes efeitos ainda não estão estabelecidos, uma vez que não observamos aumento nas interações leucócito-endotélio, especialmente na aderência, fenômeno mediado pela ICAM-1 e VCAM-1. No entanto, tem sido mostrado que estas moléculas, além de mediar a interação leucócito-endotélio, são responsáveis pelas sinalizações intracelulares que levam à contração da célula endotelial, apoptose, e migração e adesão homotípica (Wang & Doerschuk, 2002; Kluger, 2004; Cook-Mills & Deem, 2005; Yukami T, e cols. 2007). Assim, outros estudos deverão ser conduzidos para esclarecer a relevância da expressão destas moléculas pelo LOPAP e P4.

Dados anteriores mostraram que o LOPAP induz a secreção de substâncias químicas pela HUVEC que medeiam a resposta inflamatória, como a IL-8, PGI₂ e NO (Fritzen e cols, 2005). No sentido de ampliar os dados que pudessem esclarecer o papel das toxinas sobre funções inflamatórias de leucócitos e célula endotelial, a capacidade das toxinas induzirem a secreção de mediadores pro ou antiinflamatórios foi investigada. Da mesma forma que para a caracterização dos efeitos das toxinas sobre a expressão de moléculas de adesão, nesta etapa de investigação utilizamos cultura primária de célula endotelial, mas passamos a empregar neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal 4 horas após a injeção de agente irritante, no caso o glicogênio de ostra. Este procedimento é utilizado na literatura para obtenção de neutrófilos (para revisão ver Stewart e cols, 1993), uma vez que a concentração deste tipo de células na circulação de roedores é pequena em relação aos demais tipos de leucócitos (10 a 20%). Foram investigados os papéis das toxinas sobre a capacidade de secreção de citocinas pró (IL-6; TNF- α) e antiinflamatória (IL-10) e sobre a produção de NO.

Os dados obtidos mostraram que tanto o LOPAP quanto o P4 foram capazes de induzir aumento na produção de NO por neutrófilos e pela célula endotelial, embora em menor proporção que o desencadeado pelo LPS de *Salmonella abortus*, utilizado como controle positivo dos ensaios. Adicionalmente, as toxinas provocaram aumento na secreção de IL-6 e IL-10 por células endoteliais. Estes resultados, em associação à incapacidade das toxinas induzirem expressão de moléculas de adesão em neutrófilos, sugerem que as toxinas não exercem efeitos pró-inflamatórios neste subtipo de leucócitos, uma vez que aumento na expressão de $\beta 2$ -integrina e na secreção de TNF- α são indicadores de ativação neutrofílica (Mayadas TN, 2005, Sampson, 2000). Por outro lado, como já salientado, os resultados aqui obtidos indicam a ação das toxinas sobre a célula endotelial. Interessantemente, tanto a ICAM-1 e VCAM-1, como a IL-6, além de mediar a inflamação, participam de outros processos fisiopatológicos, como a cicatrização e angiogênese (Yukami T, e cols. 2007, Karst e cols, 2008). Desta forma, a real importância da indução da expressão das moléculas de adesão e da secreção de IL-6 em célula endotelial pelas toxinas ainda não está esclarecida e necessita de estudos adicionais.

A ação do LOPAP e do P4 sobre a produção de NO parece ser um evento relevante destas toxinas, já que indução da produção de NO já havia sido demonstrada anteriormente em HUVEC (Fritzen e cols, 2005). Aqui, reforçamos a capacidade de o LOPAP induzir a produção de NO pela célula endotelial, mostramos que o P4 possui esta mesma ação e que ambas as toxinas induzem a produção de NO por neutrófilos.

Como já salientado anteriormente, o NO é sintetizado por várias isoformas de NOS, constitutivas ou induzíveis na presença de estímulos apropriados, e é um mediador com amplas ações no organismo. Nossos dados permitem supor que o LOPAP e o P4 ativam uma ou mais isoformas das NOS levando a produção deste gás em neutrófilos e na célula endotelial. A ação destas toxinas sobre as NOS e o seu mecanismo de ativação será investigado futuramente.

Dentre as inúmeras ações do NO, tem sido demonstrado que este gás exerce papel importante na regulação da apoptose em diferentes tipos celulares (Li e cols, 2005). A ação do NO como indutor de apoptose está relacionada a altas concentrações e a formação de peroxinitrito (Guangwu e cols, 2008); enquanto baixas concentrações de NO podem funcionar como inibidor de apoptose, atuando por vários mecanismos de ação (Mori, 2007).

Como trabalho anterior mostrava que o LOPAP atua como protetor da apoptose em HUVEC (Fritzen e cols, 2005), investigamos no presente estudo o papel do LOPAP ou P4 na apoptose de neutrófilos e em célula endotelial da microcirculação e em neutrófilos e se o NO produzido pela ação das toxinas seria um mediador deste processo.

A apoptose foi mensurada pela marcação da anexina V em ensaios de citometria de fluxo. Durante o processo de apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar seu "suicídio" ao ambiente. Fagócitos captam este sinal e removem a célula em apoptose por fagocitose. A expressão de fosfatidilserina (PS) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre e é reconhecida pelos fagócitos. A anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos que pertence a família das anexinas na presença de íons de cálcio, que apresenta alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. Desta forma, a marcação com anexina V indica que a célula está em estado de apoptose.

Os resultados obtidos mostraram que o LOPAP e o P4 possuem a mesma magnitude de proteção sobre a apoptose induzida pela carência de soro, tanto em célula endotelial como em neutrófilos. As ações das toxinas sobre esta vias serão investigadas futuramente.

Para se aquilatar o papel do NO na proteção da apoptose induzida pelas toxinas, empregamos o bloqueio farmacológico da atividade das NOS pelo L-NAME, um análogo da L-arginina que inibe de maneira competitiva e não específica as diferentes isoformas de NOS (Hobbs, Higgs e Moncada, 1999; Klatt

e cols, 1994; Moore e cols, 1990). Sua ação é parcialmente dependente da hidrólise por esterases celulares que resulta na formação do metabólito ativo L-nitro-arginina (L-NA) (Hobbs, Higgs e Moncada, 1999). Ambos, L-NAME e L-NA são efetivos na inibição das NOS, diferindo somente na capacidade de associação e dissociação às NOS (Klatt e cols, 1994). Os nossos resultados mostraram que o tratamento com L-NAME foi efetivo pela redução significativa de produção de NO por neutrófilos em condições basais e na vigência da ação das toxinas. Nestas condições, o tratamento simultâneo de L-NAME com LOPAP ou P4 aboliu a proteção à apoptose em neutrófilos e parcialmente reverteu o processo em células endoteliais. Em conjunto, os resultados indicam que o NO produzido pela ação das toxinas está relacionado à proteção celular e que em neutrófilos esta via parece ser a preponderante, uma vez que a inibição da produção de NO aboliu a proteção à apoptose. É possível que a indução da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 e da secreção de IL-6 e IL-10 pela célula endotelial após ação das toxinas possam colaborar para a proteção à apoptose. Estas moléculas de adesão e os mediadores inflamatórios participam da inibição da morte em diferentes tipos celulares (Asensi e cols, 2004; Liu e cols, 2007; Borthwick e cols, 2003).

Em conjunto, os dados obtidos até o momento parecem descartar efeitos inflamatórios do LOPAP e do P4 em células endoteliais e neutrófilos e sugerem que os mediadores químicos secretados pela ação das toxinas, especialmente o NO, podem estar relacionados à seus efeitos citoprotetores.

Uma segunda etapa de investigação desenvolvida no decorrer desta Dissertação de Mestrado visou elucidar o papel das toxinas sobre a formação de novos vasos da rede microcirculatória. Este delineamento experimental foi baseado nas seguintes informações, a saber: 1) aplicação local de LOPAP no subcutâneo dorsal de camundongos favorece a remodelação tecidual e o processo de cicatrização após lesão física; 2) a aplicação de LOPAP diminui a formação tumoral e o número de vasos da microcirculação que circunda a área tumoral em camundongos e 3) o P4 induz a síntese de componentes da matriz

extravascular (Chudzinski-Tavassi, comunicação pessoal). Estes dados são preliminares e os mecanismos envolvidos neste efeito não são estabelecidos.

A maior parte dos ensaios realizados neste estudo empregou o modelo de câmara dorsal no subcutâneo e camundongos que permite, por meio de microscopia intravital, a visualização da rede microcirculatória por longo período de tempo (dias) em roedores. Desta forma, esta técnica tem sido empregada em diferentes estudos que caracterizam a gênese de doenças de origem inflamatória ou neoplásica e a eficácia de tratamentos na angiogênese (Oye e cols., 2007; Makale, 2007; Hightower & Intaglietta, 2007), uma vez que apresenta vantagens quando comparada a outras para o estudo da angiogênese, como a análise em modelo *ex vivo* a partir de cultura do anel de aorta (Nicosia e Ottinetti, 1990) ou a mensuração de novos vasos em embriões de galinha (Ziche e cols, 1994).

No protocolo aqui delineado, aplicamos topicamente duas doses de P4 (0,3 ou 3,0µg/10µL) e uma dose de LOPAP (3,0µg/10µL) sobre a rede microvascular a intervalos de 72 horas e observamos a morfologia vascular antes e até 10 dias após do início das aplicações. As imagens obtidas mostraram que o LOPAP e P4 alteram a microcirculação promovendo prejuízo no número de vasos em condições basais e o P4 inibe o crescimento de novos vasos frente a fator de crescimento vascular. Estes dados reforçam os possíveis papéis inibitórios das toxinas sobre a formação de novos vasos.

A inibição na formação de novos vasos pode ocorrer por inúmeros mecanismos, visto a complexidade que cerca o processo. A fase inicial do processo de angiogênese é mediada por vários fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF) e o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF), citocinas, as proteases e os inibidores de proteases provenientes de monócitos ativados, de células endoteliais, de células musculares lisas e de plaquetas. Estes mediadores químicos favorecem, num primeiro momento, a proliferação e migração de células endoteliais. Desta forma, investigamos em

células endoteliais imortalizadas de microcirculação de camundongos se o mecanismo inibitório sobre a formação de novos vasos está relacionado à capacidade de migração da célula endotelial. Os dados obtidos confirmaram a hipótese, uma vez que células incubadas com as toxinas isoladamente perdem a capacidade de migrar no meio de cultura.

Estes resultados, embora que iniciais, sugerem fortemente a ação das toxinas como inibidoras do processo de formação de novos vasos. Uma ação direta sobre a célula endotelial é aqui mostrada, no entanto a indução de componentes da síntese de componentes da matriz extravascular pode também estar relacionada ao efeito, já que estes componentes podem atuar como agentes anti-angiogênicos (para revisão ver D'amore & Thompson, 1987; Bernardini e cols, 2003).

Conclusões

- 1) A aplicação tópica de LOPAP ou P4 (10 µl de solução 30 ou 300 µg/ml) não altera o diâmetro de vênulas pós-capilares da microcirculação de mesentério de ratos; nem induz os fenômenos de interação leucócito-endotélio, nem a reatividade à NOR e ACh;
- 2) A aplicação tópica de 10 µl de 1000 µg/ml de LOPAP sobre a rede microcirculatória de mesentério de ratos promove aumento da aderência de leucócitos à parede vascular simultaneamente à estases intermitentes;
- 3) O tratamento de neutrófilos *in vitro* com LOPAP ou P4 não induz a expressão de L-selectina ou $\beta 2$ integrina nem a secreção de TNF- α e IL-6, mas aumenta a produção de NO;
- 4) O tratamento de célula endotelial primária de microcirculação de ratos com LOPAP ou P4 *in vitro* não promove secreção de TNF- α , mas induz a secreção de IL-6 e IL-10 e a produção de NO;
- 5) Os tratamentos de célula endotelial primária de microcirculação ou de neutrófilos de ratos não causam morte celular, mas inibem a apoptose provocada pela carência de soro bovino fetal;
- 6) O NO produzido pela ação do LOPAP ou P4 em célula endotelial ou neutrófilos medeia a inibição da apoptose provocada pelas toxinas;
- 7) A aplicação local de LOPAP ou P4 inibe a formação de novos vasos na rede microcirculatória do tecido subcutâneo dorsal de camundongos em condições basais e a aplicação do P4 inibe a formação de novos vasos induzida por fator de crescimento vascular;
- 8) O tratamento de células endoteliais de microcirculação de camundongos imortalizadas com LOPAP ou P4 inibe a capacidade de migração celular.

Referências Bibliográficas

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Akamine EH, Hohman TC, NigroD, Carvalho MH, de Cassia Tostes R, Fortes ZB. Minalrestat, na aldose reductase inhibitor, corrects the impaired microvascular reactivity in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Mar; 304 (3): 1236-42.

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004 Jun 25;75(6):639-53. Review.

Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):459-70. Review.

Arocha-Piñango C.L.; Perales, J.; Carvajal, Z. - Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia acheolus* (Cramer). *Thrombosis and Haemostasis*, 45(3): 233-236, 1981.

Asensi V, Valle E, Meana A, Fierer J, Celada A, Alvarez V, Paz J, Coto E, Carton JA, Maradona JA, Dieguez A, Sarasúa J, Ocaña MG, Arribas JM. *In vivo* interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):3823-8.

Assahara T, MuroharaT, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. 1997: 275:964-7.

Barnes P.J, Fan Chung K., Page, C.P. Inflammatory Mediators os Asthma: Un Update. *The Americian Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 50(4), 1998.

Benjamin, L. E.; Hemo, I. & Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated PDGF-B and VEGF. *Development.*, 125(9), 1591-1598.

Bernardini, G.; Ribatti, D.; Spinetti, G.; Morbidelli, L.; Ziche, M.; Santoni, A.; Capogrossi, M.C. & Napolitano, M. (2003). Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.*, 273(1-2), 83-101.

Bick RL. *Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice*. 3ªed. Philadelphia: Lippincott; 2002. P.1-29.

Blankenberg FG. *In vivo* detection of apoptosis. J Nucl Med. 2008 Jun; 49 Suppl 2:81S-95S. Review.

Borthwick NJ, Akbar AA, Buckley C, Pilling D, Salmon M, Jewell AP, Yong KL. Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. Clin Exp Immunol. 2003 Nov;134(2):246-52.

Brain, S.D. Immunopharmacology of the microcirculation – The handbook of immunopharmacology. Harcourt Brace & Company, Publishers. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. – Acidentes por lepdópteros. In: *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 1998.

Burke, P. A. & DeNardo, S. J. (2001). Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. Crit Rev Oncol Hematol, 39(1-2),155-171.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med., 6(4),389-95.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nat. Med., 9(6), 653-660.

Casadei, Barbara. The emerging role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of myocardial function. Experimental Physiology (2006), 91(6), 943-955.

Chen SF, Fei X, Li SH (1995). A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. Microvasc Res 50: 119–128.

Chudzinski-Tavassi, A. M.; Carrijo-Carvalho, L. C. Biochemical and biological properties of *Lonomia obliqua* bristle extract. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (2006), 12(2), 156-171.

Chudzinski-Tavassi, A.M.; Schattner, M.; Fritzen, M.; Pozner, R.; Reis, C.V.; Lourenço, D.; Lazzari, M. Effects of Lopap on human endothelial cells and platelets. *Haemostasis*, 31(3-6): 257-65, 2001

Chudzinski-Tavassi, A.M. *Lonomia obliqua* venom action on fibrinolytic system. Thromb Res 2003. *Thrombosis Research* 112(1-2): 105-110, 2003.

Coleman, John W. Nitric oxide in immunity and inflammation. International Immunopharmacology (2001), 1(8), 1397-1406.

Conway, E. M.; Collen, D. & Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res.,49(3),507-521.

Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc.Biol.* 2005 Apr; 77(4): 487-95. Review.

Cotran, R. S.; Mayadas-Norton, T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathologie Biologie* (1998), 46(3), 164-170.

D'Amore, P.A. & Thompson, R.W. (1987). Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* , 49, 453-464.

Dejana X E, Simionescu M, Wolburg H. Endothelial cell biology and pathology. *Cell Tissue Res.* Nov 2008.

Derry CJ, Faveeuw C, Mordsley KR, Ager A. Novel chondroitin sulfate-modified ligands for L-selectin on lymph node high endothelial venules. *Eur J Immunol.* 1999. Feb;29(2):419-30.

Diamond SL, Sachs F, Sigurdson WJ. Mechanically induced calcium mobilization in cultured endothelial cells is dependent on actin and phospholipase. *Arterioscler Thromb.* 1994 Dec;14(12):2000-6. PMID: 7981191.

Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol.* 2004 Oct;25(10): 536-42.

Fisher M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev Neurol Dis.* 2008;5 Suppl 1:S4-11. Review.

Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996 Aug 15;318 (Pt 1):1-14. Review.

Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 18;1482(1-2):9-24. Review.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.*, 1, 27-31.

Folkman, J. & Brem, H. (1992). Angiogenesis and inflammation. In: *Inflammation basic principles and clinical correlates*. 2th, New York: Raven Press, 821-839, 1992.

Fritzen M. Modulação de respostas de células endoteliais (HUVECs) induzidas por proteases fibrino(geno)líticas e ativadores de coagulação, obtidos de venenos animais. [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP; 2005.

Fritzen M; Flores M.P.A; Reis C.V; Chudzinski-Tavassi A.M; A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333(2): 517-523, 2005.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*;288:373-6, 1980.

Galli SJ, Tsai Mindy, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454, July 2008.

Galliera E, Corsi MM, Bonecchi R, Locati M, Mantovani A. Chemokines as pharmacological targets. *Mini Rev Med Chem*. 2008 Jun;8(7):638-46. Review.

Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Hoshino H, Kato H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 2005; 116(2): 91-100.

Garaliene V. Endothelium and nitric oxide *Medicina (Kaunas)*. Lithuanian. 2008;44(7):564-9. Review.

Garrido-Urbani, S; Bradfield P.F. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem. Soc. Trans*. 2008. Apr;36(Pt 2):203-11. Review.

Guangwu, X., Yingyu, Z., Liying, Z., Guangwen, R., Yufang, S., 2008. Bone marrow stromal cells induce apoptosis of lymphoma cells in the presence of IFN γ and TNF by producing nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 375, 666–670.

Harlan JM, Killen PD, Senecal FM, Schwartz BR, Yee EK, Taylor RF, Beatty PG, Price TH, Ochs HD. The role of neutrophil membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Blood*. 1985. Jul; 66 (1): 167-78.

Hightower CM, Intaglietta M. The use of diagnostic frequency continuous ultrasound to improve microcirculatory function after ischemia-reperfusion injury. *Microcirculation*. 2007 Aug;14(6):571-82.

Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M.S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A.T. & De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.*, 56(4), 549-80.

Hogg PJ, McLachlan EM. Blood vessels and nerves: together or not? *Lancet*. 2002 Nov 30;360(9347):1714.

Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2001 Sep;173(1):35-43. Review.

Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.*, 9, 685-693.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. Oct 4. Review.

Karst AM, Gao K, Nelson CC, Li G. Nuclear factor kappa B subunit p50 promotes melanoma angiogenesis by upregulating interleukin-6 expression. *Int J Cancer*. 2008.

Kelen, E.M.A.; Picarelli, Z.P.; Duarte, A.C. - Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemoleucinae). *J. Toxicol-Toxin Rev.*, 14:283-308, 1995.

Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J Biol Chem*. 1994 Jan 21;269(3):1674-80.

Kluger MS. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. *Adv Dermatol* 2004; 20:163-201. Review.

Larsson P, et al, Effects of IL-1 β and IL-6 on tissue-type plasminogen activator expression in vascular endothelial cells, *Thromb Res*. 10.1016/j.thomres.03.013 (2008).

Li L, Zou W. Expression of endothelin 1 and tumor necrosis factor alpha in injured renal tubules and their influences on renal interstitial fibroblasts. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 1999 Dec;28(6):445-9. Chinese.

Liu N, DU HW, Chen RH, Zheng A, Huang HP, Wu ZH. The effect of interleukin-10 on neurocyte apoptosis in cerebral ischemia in rats. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007 Jun;23(6):498-500.

Lorini LM. A taturana: aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua*. Passo Fundo: EDIUPF; 1999.

Lotufo CM, Yamashita CE, Farsky SH, Markus RP (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol* 534: 258-263.

Lokmic Z, Mitchell GM. Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Mar;14(1):87-103. Review.

Macedo SM, Lourenço EL, Borelli P, Fock RA, Ferreira JM Jr, Farsky SH. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology*. 2006 Mar 15; 220 (2-3): 126-35.

Makale M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007 Dec;81(4):329-43. Review.

Matheson Paul J; Garrison R Neal Intravital intestinal videomicroscopy : techniques and experiences. *Microsurgery* (2005), 25(4), 247-57.

Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*. 2005 Jul;26(7):388-9. Review.

Michiels, Carine. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology* (2003), 196(3), 430-443.

Moraes RHP. Identificação dos inimigos naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) e possíveis fatores determinantes do aumento da sua população. Tese apresentada à escola superior de agricultura – Universidade de São Paulo, 2002.

Mori, M., 2007. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 137, 1616S-1620S.

Musashi K, Kiryu J, Miyamoto K, Miyahara S, Katsuta H, Tamuta H, Hirose F, Yoshimura N. Thrombin inhibitor reduces leukocyte-endothelial cell interactions and vascular leakage after scatter laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Jul; 46(7): 2562-6.

Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol*. 1985 Oct;135(4):2492-7.

Pandya, R.M., Jain, S.M., Santani, D.D. 2007. Pathophysiological actions of protease activated receptors (PARs). *Pharmazie* 62(3), 163-9.

Raud J, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P. Interactions between histamine and leukotrienes in the microcirculation. Aspects of relevance to acute allergic inflammation. *Acad Sci*. 1994. Dec;1090:471.

Reis C.V, Kelen E.M.A, Farsky S.H.P, Portato F.C.V, Sampaio C.A.M, Fernandes B.L, Camargo A.C.M, Chudzinski-Tavassi A.M. A Ca^{++} activated serine protease (Lopap) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *Lancet* 353: 1942, 1999.

Reis, C.V.; Farsky, S.H.; Fernandes, B.L.; Santoro, M.L.; Oliva, M.L.; Mariano, M.; Chudzinski-Tavassi, A.M. In Vivo Characterization of Lopap, a Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom. *Thrombosis Research*, 102: 437-443, 2001.

Reis, C.V.; Portaro, F.C.V.; Andrade, S.A.; Fritzen, M.; Fernandes, B.L.; Sampaio, C.A.M.; Camargo, A.C.M.; Chudzinski-Tavassi, A.M. A Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom (Lopap) Biochemical Characterization. *Thrombosis Research*, 102: 427-436, 2001.

Reynolds, L.P.; Killilea, S.D. & Redmer, D.A. (1992). Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEBJ*, 6(3), 886-92.

Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-674. (1997).

Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças - Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. ELSEVIER, 2005.

Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann, J.N., Wiedermann, C.J., 2002. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13(8), 657-670.

Rossetti G, Collinge M, Bender JR, Molteni R, Pardi R. Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes *Immunol Rev*. 2002. Aug;186:189-207. Review. PMID: 12234372.

Saha, Ramendra N.; Pahan, Kalipada. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* (2006), 8 (5 & 6), 929-947.

Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*, 1996; 118:829-38.

Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp. Allergy*. 2000 Jun;30 Suppl 1:22-7. Review.

Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T.A., Steinhoff, M., 2008. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1309-1322

Simons M. Angiogenesis. Where do we stand now? *Circulation*. 2005;111:1556-66).

Veiga ABG, Blochtein B, Guimarães JA. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia oblique* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 2001; 39: 1343-51.

Wang Q, Doerschuk CM. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Feb; 4(1): 39-47. Review.

Wiedle G, Dunon D, Imhof BA. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001 Feb;38(1):1-31. Review.

Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. Dec;27(12):2514-23. Review.

Yack JE, Smith ML, Weatherhead J. Caterpillar talk: Acoustically mediated territoriality in larval Lepidopteras. *PNAS* 2001; 28(20):11371-5.

Yamashita, J.; Itoh, H.; Hirashima, M.; Ogawa, M.; Nishikawa, S.; Yurugi, T.; Naito, M.; Nakao, K. & Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408(6808), 92-6.

Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, Komura K, Yanaba K, Hamaguchi Y, Nagaoka T, Ogawa F, Fujimoto M, Steeber DA, Tedder TF, Takehara K, Sato S. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *J Leukoc Biol*. Sep;82(3):519-31. 2007.

Zannin M.; Lourenço D.M.; Motta G; Dalla Costa LR; Grando M; Noguti M.A.; Chudzinski-Tavassi, A.M. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(2): 355-364, 2003.

Zakaria el R, Garrison RN, Spain DA, Harris PD. Impairment of endothelium-dependent dilation response after resuscitation from hemorrhagic shock involved postreceptor mechanisms. *Shock*. 2004 Feb; 21(2): 175-81.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):2036-44.

Anexos

Anexo 1
Informações para os Membros de Banca Julgadoras de
Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Anexo 2
Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 28 /2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Ação da toxina da lagarta Lonomia obliqua sobre os vãos da microcirculação” (Protocolo CEEA nº147), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Kaline Waismam** e do orientador(a) Profa. Sandra Helena Poliselli Farsky, 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 em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/05/2007.*

São Paulo, 14 de maio de 2007.

*Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA*

Anexo 3
Outros anexos

Lopap: a non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells

Kaline Waismam^a, Ana Marisa Chudzinski-Tavassi^b, Linda C. Carrijo-Carvalho^b,
Mario T. Fernandes Pacheco^a, Sandra H. P. Farsky^{a*}

^aDepartment of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 13 B. São Paulo, SP, 05503-900, Brazil; ^bLaboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute. Av. Vital Brazil 1500, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil.

*Corresponding author: Dr Sandra H.P. Farsky

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Av Prof. Lineu Prestes 580 - Bl 13 B, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: sfarsky@usp.br

Abstract

Lopap (*Lonomia obliqua* activator protease) is a member of the lipocalin family isolated from the extract of *Lonomia obliqua* bristles. Lopap displays serine protease-like activities, including coagulation disturbance, cytokine secretion and antiapoptotic activity in human cultured endothelial cells. Here, we have investigated the effects of the recombinant protein (rLopap) on the inflammatory and apoptotic processes of neutrophils and endothelial cells from Male Wistar rats. We found that rLopap did not induce *in vivo* leukocyte-endothelial interactions in the microvasculature, initial steps of leukocyte recruitment during inflammation. Incubation of rLopap with neutrophils or endothelial cells prevented apoptosis evoked by serum deprivation and induced nitric oxide (NO) production in both cell types, and increased the expression of ICAM-1 by endothelial cells. Simultaneous incubation of endothelial cells or neutrophils with rLopap and L-NAME, a non-specific inhibitor of NO synthases, inhibited NO production and impaired the protection on apoptosis. Differently, incubation of endothelial cells with monoclonal antibody anti ICAM-1 did not change the protection on apoptosis evoked by rLopap. Together, these results indicate that rLopap does not display inflammatory properties *in vivo* but inhibits apoptosis of neutrophils and endothelial cells depending, at least in part, on NO production.

Key words: apoptosis, cytokine, ICAM-1, inflammation, leukocyte-endothelial interactions, *Lonomia obliqua*; nitric oxide, rLopap; serine-protease.

1. Introduction

LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease) is a single-chain 69 kDa lipocalin family member with serine-protease like activity, isolated from the crude extract of *Lonomia obliqua* bristles (Reis et al., 1999; Ricci-Silva et al., 2008). *In vivo* and *in vitro* assays have demonstrated that this toxin is an important component of the extract, since both crude extract and purified protein were shown to have similar effects on the blood coagulation cascade. Thrombus formation in microcirculatory vessels of the cremaster muscle, with consequent fibrinogen depletion, was observed to be dose-dependent after intravenous injection of purified LOPAP or crude extract in mice (Reis et al., 1999; 2001). In agreement with this finding, LOPAP generates *in vitro* thrombin and pre-thrombin-2, by hydrolyzing the Arg²⁸⁴-Thr²⁸⁵ peptide bond of the prothrombin molecule (Reis et al., 2001).

In addition, it has been shown that crude extract obtained from the bristles induced an inflammatory response in mice, which was characterised by enhanced influx of leukocytes into the subcutaneous cavity (Ramos et al., 2004). Recently, it was demonstrated that the crude extract also induced gene expression of proinflammatory cytokines, interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), chemokine ligand-2 (CCL2) and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) in cultured human fibroblasts (Pinto et al., 2008).

It seems that Lopap may contribute to the inflammatory properties of the crude extract, since incubation of human vein endothelial cells (HUVECs) with the purified protein caused high expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and E-selectin (Chudzinski-Tavassi et al., 2001; Fritzen et al., 2005). These molecules are expressed in endothelial cells and are responsible for

leukocyte adherence to the vessel wall during diapedesis and intracellular signalling during inflammation (Cook-Mills and Deem, 2005; Hordijk, 2006).

On the other hand, Lopap also evoked the production of nitric oxide (NO) and secretion of prostacyclin-1 (PGI₂) by HUVECs (Fritzen et al., 2005). NO and PGI₂ produced by endothelial cells have been implicated as modulators of the leukocyte migration into inflammatory sites, by acting on leukocyte-endothelial interaction steps (Kubes et al., 1991; Lindemann et al., 2003) and on expression and activity of adhesion molecules expression (Mitchell et al., 1998; Lindemann et al., 2000; Dal Secco et al., 2006). Nevertheless, the role of NO as inhibitor or inductor of the process is controversial and seems to be dependent on source and amount of NO at the site of action (Dal Secco et al., 2003; Hebeda et al., 2008).

Additionally, Lopap prevented HUVEC apoptosis induced by serum deprivation (Fritzen et al., 2005). We have hypothesized that expression of endothelial adhesion molecules and secretion of chemical mediators may participate of the cytoprotective effects of Lopap, as NO modulates apoptosis in several types of cells (Li et al., 2005; Dal Secco et al., 2003; Zeini et al., 2005) and ICAM-1 expression has been correlated to pro- or antiapoptotic effects in different cells, depending on the conditions of disease (Cheng et al., 2008; Martinesi et al., 2008).

Therefore, this work was carried out to evaluate the inflammatory and apoptotic properties of the recombinant Lopap (rLopap) in endothelial cells and neutrophils. *In vivo* and *in vitro* assays were designed using rLopap and male Wistar rats as an experimental model. Data presented herein show that rLopap does not display leukocyte interaction into endothelium *in vivo* and pro-

inflammatory cytokine secretion by neutrophils and endothelial cells, but prevented apoptosis of both neutrophils and endothelial cells, mediated, at least in part, by NO production.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Monoclonal antibodies were purchased from BD PharMingen Technical (San Diego, CA, USA). N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanin, EDTA, oyster glycogen, norepinephrine and acetylcholine was purchased from Sigma. Elisa Kits for IL-6 and TNF- α were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, pancreatin and gentamycin reagent solution were purchased from GIBCO BRL Products (Grand Island, NY, USA). Sodium pentobarbital was purchased from Cristália (São Paulo, Brazil). rLopap was obtained according Reis et al., 2006.

2.2. Animals

Male Wistar rats weighing 180–220 g were used. The animals were fed a standard pellet diet and water *ad libitum*. Before each experimental procedure, the animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (65mg/kg, i.p.) to avoid stress. All procedures carried out on the animals were done according to protocols approved by the local Committee for Ethical Surveillance in Animal Experimentation (COBEA) for the proper use and care of experimental animals.

2.3. Intravital microscopic assay: leukocyte-endothelial interactions and microvascular reactivity

The mesentery of rats was surgically exteriorized and kept on a transparent platform thermostatically controlled at 37°C to be transilluminated. The tissue was irrigated with a warmed Ringer-Locke solution (pH 7.2-7.4; 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM CaCl₂ · 2H₂O, 6 mM NaHCO₃ and 5 mM glucose) containing 1% gelatine. Transilluminated images were obtained by optical microscopy (Axioplan II, Carl-Zeiss, Germany, equipped with x 5.0/0.30 plan-neofluar or x 10.0/0.25 Achromplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and x 1.0, 1.25 or 1.60 optovar) and were captured by a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss, Germany) connected to the microscope. The images were transmitted simultaneously to a TV monitor and to a computer. Digitized images on the computer monitor were analyzed by image-analysis software (KS 300, Kontron, Germany).

The interaction between leukocytes and vessel walls was evaluated by determining the number of rolling and adhered leukocytes on the postcapillary venule wall (20-30 µm diameter, 200 µm length) at 10-minute intervals. Quantification was carried out 10 minutes after topical application of 10 µl of rLopap at concentrations of 30 µg/ml, 300 µg/ml or 1mg/ml or the equivalent volume of sterile saline. Positive control for the assay was performed by topical application of N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP, 10⁻⁸M, 10 µl). Three fields from each animal were evaluated. Leukocytes moving in the periphery of the axial stream, in contact with the endothelium, were considered to be rollers. The number of leukocytes stopped at the vessel wall (adhered cells) was determined for the same vascular segments.

2.4. Flow cytometry: adhesion molecules expression and cell viability

Peripheral leukocytes were isolated from blood collected from the abdominal aorta, using EDTA (2 mg/ml) as an anticoagulant. After erythrocytes lyses (ammonium chloride solution, 0.13M), leukocytes were recovered after washing with Hanks' salt balanced solution (HBSS) and 1×10^6 cells were incubated with rLopap (300 µg/ml, for 15 or 30 minutes, 37°C). Incubations with FMLP 10^{-8} M were used as a positive control. After being washed, leukocytes were further incubated for 20 minutes at 4°C in the dark with L-selectin or $\beta 2$ integrin monoclonal antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; 0.5 µg/10 µl).

Primary cultures of microvascular endothelial cells were obtained from the cremaster muscle of the rats using the method described by Lotufo et al., 2006. Pure cultures of endothelial cells were identified by expression of PECAM-1 and von Willebrand factor using confocal microscopy. Briefly, the cremaster muscles were isolated from rats and small pieces were placed into a flask and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 20% fetal calf serum and 1% gentamycin. After 48 h, the tissues were discarded and the medium was changed. The cells were subcultured with 10% pancreatin in phosphate-buffered saline solution and used for assays on the eighth day, when they achieved confluence. Cells were then incubated with medium or rLopap (300 µg/ml, for 4 or 8 hours, 37°C). Afterward, they were suspended by using a cell scraper and incubated with monoclonal antibody, anti-ICAM-1, anti-VCAM-1 or anti PECAM-1 conjugated with FITC, for 20 minutes at 4°C in the dark.

Neutrophils and primary cultured endothelial cells were used to evaluate the effects of rLopap on apoptosis and necrosis. Neutrophils were obtained from the peritoneal cavity four hours after local injection of oyster glycogen (20 ml of 1% solution) and primary cultured endothelial cells were obtained as described above. After washing with HBSS, 1×10^6 neutrophils or endothelial cells were incubated with DMEM (endothelial cells) or RPMI (neutrophils) containing 1, 10 or 20% of fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. In order to evaluate the effects of NO or ICAM-1 on the apoptotic activity of rLopap, neutrophils or endothelial cells were simultaneously incubated with L-NAME (1M) and rLopap (300 $\mu\text{g/ml}$). Endothelial cells were incubated with biotin labeled monoclonal antibody, anti-ICAM-1 (0.5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) and rLopap (300 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. At the end of treatments, cells were incubated with FITC annexin V (1:500) for 20 minutes at room temperature in the dark to quantify apoptotic cells. At the moment of flow cytometry analysis, propidium iodide (10 μl of 50 mg/ml solution) was added in order to quantify necrosis.

The quantification of adhesion molecule expressions, apoptosis or necrosis was carried out in a FACScalibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 cells were obtained and only the morphologically viable leukocytes and endothelial cells were considered in the analysis of adhesion molecule expressions.

2.5. *Immunoenzymatic assay*

Neutrophils or confluent cultured endothelial cells (1×10^6) were incubated with rLopap (300 $\mu\text{g/ml}$, 500 μl , 18 hours) or lipopolysaccharide of *Salmonella abortus* (LPS, 1mg/ml, 500 μl , 18 hours). Concentrations of IL-6 and TNF- α

were quantified in the supernatants by immunoenzymatic assays using commercial kits.

2.6. Griess Reaction

Neutrophils were incubated with rLopap (300 µg/ml; 500 µl, 18 hours) or LPS (1 mg/ml, 500 µl, 18 hours) and cultured endothelial cells were submitted to equivalent treatments and incubated for 48 hours. The amount of the stable metabolite NO_2^- in the culture supernatants was measured by Griess reaction. Briefly, 100 µl of supernatant was incubated with 100 µl of Griess reagent (sulphanilamide solution 1% and α naphthyl ethyl diamine solution 0.1%) for 10 minutes. The absorbance was monitored at 550 nm.

2.7. Data and statistical analyses

Means and standard error mean (s.e.m.) of all data are presented and were compared by Student's t-test or ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparisons. GraphPad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA) was employed. The differences were considered to be significant when P was less than 0.05.

3. Results

3.1. *Effects of rLopap on in vivo leukocyte-endothelial interactions*

Topical application of rLopap to the microcirculatory network of the mesentery did not induce rolling or adherence of leukocytes to endothelium of postcapillary venules (Figure 1). The concentrations of rLopap employed in this study (30 µg/ml or 300 µg/ml; 10 µl) did not modify the blood flow or diameter of the vessels (data not shown). Topical application of higher concentrations of Lopap (1 mg/ml; 10 µl) caused thrombus formation at the vessel wall and intermittent stasis of blood flow in the microcirculatory vessels. Similar observations were made after systemic injection of crude extract or purified Lopap in mice (Reis et al., 1999, 2001).

Topical application of FMLP (10^{-8} M; 10 µL), used in control assays enhanced both events (Basal rolling= 120 ± 14 ; FMLP induced rolling= $179 \pm 9^*$; Basal adherence: 5 ± 1 ; FMLP induced adherence= $22 \pm 3^*$; n=5; *p<0.05 vs basal values).

3.2. *Effects of rLopap on expression of adhesion molecules*

Circulating leukocytes or primary cultured endothelial cells were *in vitro* incubated with rLopap to quantify the expressions of adhesion molecules by flow cytometry. rLopap did not modify the expression of L-selectin and $\beta 2$ integrin in neutrophils and the constitutive expression of endothelial VCAM-1 and PECAM-1 (Figure 2). However, rLopap enhanced the expression of ICAM-1 in the membrane of endothelial cells (Figure 2). It is important to emphasize that expression of neutrophils or endothelial cells induced by FMLP or LPS, respectively, were used as positive controls.

3.3. *Effects of rLopap on secretion of pro-inflammatory cytokines and production of NO*

Circulating neutrophils represent about 10-20% of leukocytes in the peripheral blood of rats, which impairs the collection of high amount of these cells from blood. Neutrophils migrated to rat peritoneal cavity in response to oyster glycogen have been employed to *in vitro* assays (Mello et al., 1992; Farsky et al., 1997; Lagranha et al., 2007). Therefore, we employed migrated neutrophils and primary cultured endothelial cells to investigate the role of rLopap on secretion of TNF- α or IL-6 or production of NO. Results presented in Figure 3 show that rLopap did not induce secretion of both cytokines by neutrophils or endothelial cells. On the other hand, NO production was stimulated by rLopap in both types of cells (Figure 3).

In all experiments, cells were incubated with known stimulatory agents (FMLP or LPS), as positive controls.

3.4. *Effects of rLopap on neutrophils or endothelial cells viability*

Cell viability was quantified by necrosis and apoptosis of neutrophils and endothelial cells using flow cytometry. Incubation of rLopap with both cell types did not induce necrosis or apoptosis (Figure 4A and C). Neutrophil or endothelial cell incubated during 24 hours in culture medium containing lower amount of FSB (1%; serum deprivation) were apoptotic. However, simultaneous incubation of rLopap prevented the cell apoptosis caused by serum deprivation (Figure 4A and C).

3.5. *Participation of NO on protective effect of rLopap on apoptosis of neutrophils and endothelial cells*

To evaluate the participation of NO on the protective effect of rLopap on apoptosis, neutrophils or endothelial cells were simultaneously incubated with L-NAME and rLopap. Results presented in Figures 4B and D show that L-NAME treatment abolished or reduced the protective effect of rLopap on neutrophils or endothelial cells apoptosis, respectively. The levels of NO_2^- in neutrophils incubated with L-NAME were reduced and confirmed the effectiveness of treatment, as demonstrated by the follow values: serum deprivation= 9 ± 0.30 ; serum deprivation + L-NAME= $6 \pm 0.12^*$; serum deprivation + rLopap= $25 \pm 1.20^{**}$; serum deprivation + L-NAME + rLopap= $10 \pm 0.20^{***}$ (n=4; $^*p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ vs serum deprivation; $^{***}p < 0.001$ vs serum deprivation + rLopap).

3.6. *Participation of ICAM-1 on protective effect of rLopap on apoptosis of endothelial cells*

Primary endothelial cells cultured in serum deprived medium were incubated with rLopap and anti-rat monoclonal antibody against ICAM-1. Percentage of viable cells was similar in cultured endothelial cells treated with rLopap and with rLopap and anti ICAM-1 (Figure 5).

4. Discussion

Serine proteases are active mediators of diverse biological processes, including digestion of dietary proteins, blood coagulation, and homeostasis. Particularly abundant in animal venoms, serine proteases participate in mobilization and digestion of the prey (Kini, 2005). Based on their biological properties, isolated serine proteases from animal venoms have been used as scientific tools and design models for drug development (Kini, 2005). This work was carried out to elucidate the actions of recombinant serine protease like rLopap, a member of lipocalin family isolated from *Lonomia obliqua* caterpillar, on cellular functions related to inflammation and apoptosis.

Recently it has been demonstrated that serine proteases, especially those involved in the coagulation system such as factor X and thrombin, act via protease-activated receptors (PARs) to signal activation of inflammatory cells. These signalling events mediate motility, cytokine production and adhesion molecule expression by leukocytes and endothelial cells (Roemisch et al., 2002; Pandya et al., 2008; Shpacovitch et al., 2008).

Neutrophils are the first cell recruited into focus of lesion, in a process highly mediated by expression of adhesion molecules in cell membranes, orchestrated by action of chemical mediators secreted by different cells. The initial step of cell recruitment is regulated by three sequential steps initiated by selectin-mediated capturing and rolling, followed by chemokine-triggered activation and integrin-dependent adherence on endothelial immunoglobulin superfamily (Muller, 2003; Alon and Ley, 2008). Data presented here show that rLopap did not induce *in vivo* rolling or adherence of circulating cells into vessel wall and did not evoke expressions of L-selectin or $\beta 2$ integrin in neutrophil

membrane. These results indicate that rLopap does not have a role in the neutrophils interactions into endothelium and suggest that rLopap does not induce inflammatory properties in neutrophils, as enhanced expressions of these molecules are markers of cell activation (Chishti et al., 2004). The inability of rLopap to evoke secretion of pro-inflammatory cytokines TNF- α or IL-6 corroborates this hypothesis. rLopap also did not induce expression of PECAM-1 and VCAM-1 and cytokine secretion by endothelial cells.

Nevertheless, elevated expression of ICAM-1 in endothelial cell membrane and enhanced production of NO was observed in neutrophils and endothelial cells incubated with rLopap. The induction of NO production and ICAM-1 expression by Lopap had already been demonstrated in HUVECs (Fritzen et al., 2005). Here we corroborated these results using the recombinant protein and primary cultured endothelial cell obtained from rat microvasculature and describe, for the first time, the action of the toxin on NO production by neutrophils.

Studies carried out with different cell lineages have demonstrated that NO modulates apoptosis (Moreno et al., 2001; Li et al., 2005; Zeini et al., 2005; Mori, 2007). The action of NO as an inducer of apoptosis is related to its high concentrations and peroxynitrite formation (Guangwu et al., 2008), whereas low levels of NO may function to inhibit apoptosis, by inducing heat shock protein 70 (Hsp70) (Mori, 2007).

We have clearly shown that NO produced as a result of rLOPAP exposure is associated with the antiapoptotic effects evoked by the protein. Blockade of NO synthases activity by L-NAME treatment inhibited NO

production and completely reversed or reduced the antiapoptotic effect of rLopap in neutrophils and endothelial cells.

The role of serine proteases in cell survive and NO production has been examined, mainly by activation of their receptors (Hirano et al., 2007). Tissue factor (TF), factor VIIa and factor Xa promote cell survival by a mechanism involving PAR-2 (Versteeg et al., 2004; Jiang, et al., 2006; Versteeg et al., 2008), and thrombin has also been reported as a potent anti-apoptotic factor via PAR-1 activation (Zania et al., 2008). However, induction or inhibition of apoptosis in different cells has been demonstrated after PAR-1 activation, depending on the concentration of the agonists (Flynn and Buret, 2004). Signalling pathways involved in the induction or prevention of apoptosis by PAR-1 activation are diverse, and include JAK/STAT, RhoA, myosin light chain kinase, ERK1/2, and various Bcl-2 family members (Flynn and Buret, 2004). Therefore, the participation of PARs and the intracellular pathways in the rLopap effects here observed will be further investigated.

Elevated expression of ICAM-1 in endothelial cell is associated to intracellular signalling in pathophysiological conditions, such as inflammation, lymphocyte trafficking, endothelial contraction and apoptosis (Lehmann et al., 2003; Perez et al., 2007; Vestweber, 2007; Cheng et al., 2008; Martinesi et al., 2008). Here we show that ICAM-1 expressed in endothelial cells by rLopap may not be related to its antiapoptotic effect. The biological significance of expression of ICAM-1 by rLopap remains to be clarified.

Taken together, our findings show that rLopap, a member of lipocalin family with serine protease activities, does not induce *in vivo* and *in vitro*

inflammatory properties in neutrophils and endothelial cells, and address to its protective role on the apoptosis of endothelial cells and neutrophils, depending on NO production.

Acknowledgements

The authors thank to Jorge M Ferreira for technical assistance. Kaline Waismam is graduate fellow at FAPESP (grant no. 06/58643-0).

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

Reference

Reis, C.V., Kelen, E.M.A., Farsky, S.H.P., Portato, F.C.V., Sampaio, C.A.M., Fernandes, B.L., Camargo, A.C.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 1999. A Ca^{++} activated serine protease (Lopap) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *Lancet* 353, 1942.

Ricci-Silva, M.E., Valente, R.H., León, I.R., Tambourgi, D.V., Ramos, O.H.P., Perales, J., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2008. Immunochemical and proteomic technologies as tool for unravelling toxins involved in envenoming by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 51, 1017-1028.

Reis, C.V., Farsky, S.H.P., Fernandes, B.L., Santoro, M.L., Oliva, M.L., Mariano, M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2001. *In Vivo* Characterization of Lopap, a Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom. *Thromb. Res.* 102, 437-443.

Ramos, A. T., Gonçalves, L. R., Ribeiro, O. G., Rocha Campos, A. C., Sant'Anna, O. A., 2004. Effects of *Lonomia obliqua* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. *Toxicon* 43, 761-768.

Pinto, A.F., Dragulev, B., Guimarães, J.A., Fox, J.W., 2008. Novel perspectives on the pathogenesis of *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation based on assessment of host response by gene expression analysis. *Toxicon* 51, 1119-1128.

Chudzinski-Tavassi, A.M., Schattner, M., Fritzen, M., Pozner, R., Reis, C.V., Lourenço, D., Lazzari, M., 2001. Effects of Lopap on human endothelial cells and platelets. *Haemostasis* 31, 257-265.

Fritzen, M., Flores, M.P.A., Reis, C.V., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2005. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 517-523.

Cook-Mills, J.M., Deem, T.L., 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77(4), 487-95.

Hordijk, P.L., 2006. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS J.* 273(19), 4408-4415.

Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N., 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 4651-4655.

Lindemann, S., Gierer, C., Darius, H., 2003. Prostacyclin inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocytes to human vascular endothelial cells due to adhesion molecule independent regulatory mechanisms. *Basic Res. Cardiol.* 98, 8-15.

Mitchell, D.J., Yu, J., Tymiński, K., 1998. Local L-NAME decreases blood flow and increases leukocyte adhesion via CD18. *Am. J. Physiol.* 274(4 Pt 2), H1264-1268.

Lindemann, S., Sharafi, M., Spiecker, M., Buerke, M., Fisch, A., Grosser, T., Veit, K., Gierer, C., Ibe, W., Meyer, J., Darius, H., 2000. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb. Res.* 97(3), 113-123.

Dal Secco, D., Moreira, A.P., Freitas, A., Silva, J.S., Rossi, M.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2006. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* 15(1), 77-86.

Dal Secco, D., Paron, J.A., de Oliveira, S.H., Ferreira, S.H., Silva J.S., Cunha, F.Q., 2003. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 9(3), 153-164.

Hebeda, C.B., Teixeira, S.A., Muscará, M.N., Vinolo, M.A., Curi, R., Mello, S.B., Farsky, S.H., 2008. In vivo blockade of Ca⁺²-dependent nitric oxide synthases impairs expressions of L-selectin and PECAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377(2), 694-698.

Li, C.Q., Wogan, G.N., 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226, 1-15.

Zeini, M., Hortelano, S., Traves, P. G., Gomez-Valades, A. G., Pujol, A., Perales, J.C., Bartrons, R., Bosca, L., 2005. Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *FASEB J.* 19, 995–997.

Cheng, C.Y., Su, S.Y., Tang, N.Y., Ho, T.Y., Chiang, S.Y., Hsieh, C.L., 2008. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.* 1209, 136-150.

Martinesi, M., Treves, C., d'Albasio, G., Bagnoli, S., Bonanomi, A. G., Stio, M., 2008. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 597-604.

Reis, C.V., Andrade, S.A., Ramos, O.H.P., Ramos, C.R.R., Hoo, P.L., Batista, I.F.C., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2006. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. *Biochem. J.* 398, 295-302.

Lotufo, C.M., Yamashita, C.E., Farsky, S.H., Markus, R.P., 2006. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 258-263.

Mello, S.B., Farsky, S.H., Sannomiya, P., Garcia-Leme, J. 1992. Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with a plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. *J. Leukoc. Biol.* 51(1), 46-52.

Farsky, S.H., Walber, J., Costa-Cruz, M., Cury, Y., Teixeira, C.F., 1997. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon* 35(2), 185-193.

Lagranha, C.J., Hirabara, S.M., Curi, R., Pithon-Curi, T.C., 2007. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochem. Funct.* 25(5), 563-569.

Kini, R.M., 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34(4-5), 200-204.

Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann, J.N., Wiedermann, C.J., 2002. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13(8), 657-670.

Pandya, R.M., Jain, S.M., Santani, D.D. 2007. Pathophysiological actions of protease activated receptors (PARs). *Pharmazie* 62(3), 163-9.

Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T.A., Steinhoff, M., 2008. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1309-1322.

Muller, W.A., 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24(6), 327-334.

Alon, R., Ley, K., 2008. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20(5), 525-532.

Chishti, A.D., Shenton, B.K., Kirby, J.A., Baudouin, S.V., 2004. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* 30, 605-611.

Moreno, A., Villar, M.L., Cámara, C., Luque, R., Cespón, C., González-Porqué, P., Roy, G., López-Jiménez, J., Bootello, A., Santiago, E.R., 2001. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 97(1), 242-249.

Mori, M., 2007. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 137, 1616S-1620S.

Guangwu, X., Yingyu, Z., Liying, Z., Guangwen, R., Yufang, S., 2008. Bone marrow stromal cells induce apoptosis of lymphoma cells in the presence of IFN γ and TNF by producing nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 666–670.

Hirano, K., Nomoto, N., Hirano, M., Momota, F., Hanada, A., Kanaide, H., 2007. Distinct Ca²⁺ requirement for NO production between proteinase-activated receptor 1 and 4 (PAR1 and PAR4) in vascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322(2), 668-677.

Versteeg, H.H., Spek, C.A., Richel, D.J., Peppelenbosch, M.P., 2004. Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene* 23(2), 410-417.

Jiang, X., Guo, Y.L., Bromberg, M.E., 2006. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb. Haemost.* 96(2), 196-201.

Versteeg, H.H., Borensztajn, K.S., Kerver, M.E., Reitsma, P.H., Spek, C.A., Peppelenbosch, M.P., 2008. TF:VIIa-specific activation of CREB upregulates proapoptotic proteins via PAR2. *J. Thromb. Haemost.* 6(9), 1550-1557.

Zania, P., Papaconstantinou, M., Flordellis, C.S., Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N.E., 2008. Thrombin mediates mitogenesis and survival of

human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294(5), C1215-1226.

Flynn, A.N., Buret, A.G., 2004. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis* 9(6), 729-737.

Lehmann, J.C., Jablonski-Westrich, D., Haubold, U., Gutierrez-Ramos, J.C., Springer, T., Hamann, A., 2003. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J. Immunol.* 171(5), 2588-2593.

Perez, O.D., Mitchell, D., Nolan, G.P., 2007. Differential role of ICAM ligands in determination of human memory T cell differentiation. *BMC Immunol.* 8, 2.

Vestweber, D., 2007. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* 218, 178-196.

Legend for Figures

Figure 1: Effects of rLopap on leukocyte-endothelial interactions in mesentery microcirculation. Rolling and adhered leukocytes in postcapillary venules were quantified 10 minutes after topical application of sterile saline or rLopap. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of six animals in each group.

Figure 2: Effects of rLopap on expression of adhesion molecules in membranes of leukocytes and endothelial cells. Cells were incubated with sterile saline, rLopap (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or FMLP (10^{-8}M) and adhesion molecule expression was quantified by flow cytometry. A= L-selectin; B= $\beta 2$ integrin; C= ICAM-1; D= VCAM-1; E= PECAM-1. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of cells collected from six animals. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. respective saline-treated cells.

Figure 3: Effects of rLopap on secretion of chemical mediators by neutrophils and endothelial cells. Cells were incubated with sterile saline, rLopap (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and cytokine secretion was quantified by ELISA and NO production by Griess reaction. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of cells collected from six animals. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. respective saline-treated cells; # $P < 0.01$ vs. LPS-treated cells.

Figure 4: Effects of rLOPAP on endothelial cell and neutrophil viability. Cells were incubated with sterile saline or rLopap (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in: culture medium containing 1, 10 or 20% of FBS (Panels A and C); culture medium containing 1% FBS simultaneously with L-NAME (1mM, Panels B and D). Apoptotic cells were quantified 24 hours after incubations by flow cytometry using FITC-labeled

annexin V and necrotic cells by addition of propidium iodide. Results shown are means $\pm$ s.e.m. of cells obtained from four animals. *** $P < 0.001$ vs. respective saline-treated cells and respective L-NAME-treated cells; ** $P < 0.01$ vs Lopap-treated cells.

Figure 5. Role of ICAM-1 expression on rLopap apoptosis protection. Endothelial cells were simultaneously incubated with cultured medium containing 1% FBS and saline; monoclonal antibody anti ICAM-1 (Ac ICAM-1); rLopap (LOPAP); and rLopap and monoclonal antibody anti ICAM-1 (Lopap + Ac ICAM-1). Apoptotic cells were quantified 24 hours after incubation by flow cytometry using FITC-labeled annexin V. Results shown are means $\pm$ s.e.m. of cells obtained from four animals. *** $P < 0.001$ vs. Saline; ## $P < 0.001$ vs. Ac ICAM-1.

Figure 1

Neutrophils

Endothelial cells

Figure 2

Neutrophils

Endothelial cells

Figure 3

Neutrophils

A

B

Endothelial cells

C

D

Figure 4

Figure 5