

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

LEANDRO BARBOSA DO PRADO

**EFEITOS DE PEPTÍDEOS RICOS EM PROLINA DO VENENO DA
SERPENTE *BOTHRUPS JARARACA* SOBRE A REVASCULARIZAÇÃO DE
MEMBROS POSTERIORES ISQUÊMICOS DE CAMUNDONGOS
NORMOGLICÊMICOS E HIPERGLICÊMICOS**

Belo Horizonte

Minas Gerais

2017

LEANDRO BARBOSA DO PRADO

**EFEITOS DE PEPTÍDEOS RICOS EM PROLINA DO VENENO DA
SERPENTE *BOTHROPS JARARACA* SOBRE A REVASCULARIZAÇÃO DE
MEMBROS POSTERIORES ISQUÊMICOS DE CAMUNDONGOS
NORMOGLICÊMICOS E HIPERGLICÊMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos
(Dep. Fisiologia e Biofísica, UFMG)

Co-orientadora: Dra. Danielle Alves Ianzer
(Dep. Ciências Fisiológicas, UFG)

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2017

Agradecimentos

- Primeiramente, agradecer meus pais **Denys e Márcia** pelo apoio incondicional, pelo suporte emocional e por sempre acreditarem em mim;
- Ao meu irmão **Pedro**, pela força e incentivo em querer sempre mais;
- À minha namorada, **Amanda Vargas**, por todo amor e compreensão;
- Aos meus queridos amigos de Divinópolis-MG, pela companhia, pelas palavras de incentivo e momentos de lazer.
- À **Cintia e Rodney**, secretários do Programa de pós-graduação de Fisiologia e Farmacologia, pelos cordiais e eficientes serviços prestados;
- À Professora **Silvia Passos** pela prestatividade e hospitalidade, que lhe é tão peculiar;
- À **Danielle Ianzer**, pela co-orientação no trabalho e pela disponibilidade dos *Bj-PROs*.
- Ao Professor **Mauro Teixeira** pela a disponibilidade do equipamento de Citometria de Fluxo, pela colaboração e infra-estrutura para realização deste trabalho.
- Aos órgãos de fomento CNPq, a CAPES, a FAPEMIG e a FAPESP;
- A todos professores do Programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia pelos conhecimentos repassados e pela oportunidade de poder participar deste programa de alto nível técnico-científico;
- Aos meus queridos amigos do Laboratório de Angiogênese, pelos trabalhos diários, ajuda nos experimentos, discussões científicas e pelas boas risadas.

- Em especial, à minha orientadora **Profa. Lucíola Barcelos** pelos fraternos 6 anos de trabalho juntos, por me ensinar e interpretar ciência, pelo apoio e confiança e por ser a principal responsável pela minha evolução como pesquisador.

RESUMO

A angiogênese terapêutica tem sido proposta como uma alternativa para o tratamento de doenças isquêmicas, tais como a Doença Arterial Periférica. Inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), além de suas propriedades anti-hipertensivas, também são capazes de aumentar a angiogênese induzida por isquemia. Os iECA foram desenvolvidos com base nos primeiros oligopeptídeos ricos em prolina do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (*Bj*-PROs) conhecidos como peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs). No entanto, os efeitos anti-hipertensivos de novos *Bj*-PROs, dentre eles *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c, não estão relacionados à sua capacidade em inibir a ECA. Portanto, nosso objetivo foi avaliar se esses novos peptídeos (71 nmol/Kg, i.p., a cada 24h) afetariam a revascularização de membros posteriores isquêmicos (modelo de oclusão da artéria femoral – OAF) de animais normoglicêmicos e/ou hiperglicêmicos (modelo de diabetes tipo I – DM1 – induzida por estreptozotocina – STZ). Observamos efeitos benéficos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na recuperação do fluxo sanguíneo dos membros isquemiados e no aumento da densidade de capilares e de arteríolas, bem como dos níveis VEGF nos músculos de animais normoglicêmicos. Além disso, esse peptídeo estimulou a mobilização de células-tronco angiogênicas (CTA's) da medula óssea para o sangue. Interessantemente, todos esses efeitos foram abolidos em animais nocautes para o receptor B1 de Bradicinina (B1R-KO), mas não em animais B2R-KO ou em animais selvagens tratados com L-NAME. Não observamos, entretanto, melhora na recuperação do fluxo sanguíneo de membros isquemiados em animais com DM1 induzido por STZ tratados com *Bj*-PRO-5a. Nosso grupo já havia demonstrado que os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c estimulam a revascularização de membros posteriores isquêmicos de animais normoglicêmicos. Avaliamos, então, os efeitos desses peptídeos sobre a revascularização de membros isquêmicos de animais com DM1. Nossos resultados demonstraram uma melhora na recuperação do fluxo sanguíneo e aumento significativo na angiogênese e arteriogênese. Além disso, *Bj*-PRO-7a, mas não *Bj*-PRO-10c, estimulou a mobilização de CTAs para o sangue. Interessantemente, embora nenhum desses peptídeos tenha alterado o quadro de intolerância à glicose apresentado pelos animais com DM1, o peptídeo *Bj*-PRO-7a, mas não o *Bj*-PRO-10c, apresentou efeito hipoglicemiante. Em conclusão, nossos dados sugerem que o peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a recuperação de membros posteriores isquêmicos de camundongos normoglicêmicos, mas não daqueles com DM1. Esses efeitos parecem envolver a atividade do receptor B1R de cininas e são parcialmente dependentes da liberação de óxido nítrico, mas são independentes da atividade do receptor B2R. Além disso, os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c são capazes de estimular a revascularização de membros posteriores isquêmicos em camundongos com DM1.

ABSTRACT

Therapeutic angiogenesis has been proposed as an alternative for the treatment of ischemic diseases, such as Peripheral Artery Disease. Inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACEi), in addition to their antihypertensive properties, are also capable of increasing ischemia-induced angiogenesis. ACEi have been developed based on the first prolin-rich oligopeptides of *Bothrops jararaca* venom (Bj-PROs) previously known as bradykinin potentiating peptides (BPPs). However, the antihypertensive effects of novel Bj-PROs, among them Bj-PRO-5a, Bj-PRO-7a and Bj-PRO-10c, are not related to their ability to inhibit ACE. Therefore, our aim was to evaluate whether these new peptides (71 nmol / kg, i.p., every 24 hours) would affect ischemic hindlimb revascularization (femoral artery occlusion model - FAO) of normoglycemic and/or hyperglycemic animals (Type I diabetes - DM1 - induced by streptozotocin - STZ). We observed beneficial effects of the Bj-PRO-5a peptide on ischemic limbs blood flow recovery and increased capillary and arteriolar densities as well as VEGF levels in the ischemic muscles of normoglycemic animals. In addition, this peptide stimulated the mobilization of circulating angiogenic cells (CACs) from the bone marrow. Interestingly, all of these effects were abolished in mice knockouts for the Bradykinin B1 receptor (B1R-KO), but not in B2R-KO animals or wild-type (WT) animals treated with L-NAME. However, we did not observe improvement in the blood flow recovery of ischemic hindlimbs in STZ-induced diabetic animals treated with the peptide Bj-PRO-5a. Of note, our group has previously demonstrated that peptides Bj-PRO-7a and Bj-PRO-10c stimulate revascularization of ischemic hindlimbs of normoglycemic animals. Here, we then evaluated the effects of these peptides on the revascularization of ischemic hindlimbs of animals with STZ-induced DM1. Our results demonstrate an improvement in blood flow recovery and a significant increase in angiogenesis and arteriogenesis. In addition, Bj-PRO-7a, but not Bj-PRO-10c, stimulated the mobilization of CACs into the blood. Interestingly, although none of these peptides altered the glucose intolerance of the DM1 group, the peptide Bj-PRO-7a, but not Bj-PRO-10c, presented a hypoglycemic effect. In conclusion, our data suggest that the Bj-PRO-5a peptide enhances the revascularization of ischemic hindlimbs from normoglycemic mice, but not from those with DM1. These effects seem to involve the activity of the kinin B1R receptor and are partially dependent on the release of nitric oxide, but are independent of B2R receptor activity. In addition, the peptides Bj-PRO-7a and Bj-PRO-10c are capable of stimulating revascularization of ischemic hindlimbs in mice with DM1.

Lista de Figuras

Figura 1: Processos de formação de vasos sanguíneos: angiogênese, arteriogênese e vasculogênese.....	17
Figura 2: Processos de neovascularização em resposta à obstrução arterial.....	18
Figura 3: Imagens representativas da estratégia de “gating” utilizada para análise das populações de CTAs por citometria de fluxo.....	36
Figura 4: Desing experimental.....	38
Figura 5: Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais normoglicêmicos após OAF.....	42
Figura 6: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.....	44
Figura 7: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a arteriogênese <i>de novo</i> e por remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.....	46
Figura 8: Fotomicrografias de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS e <i>Bj</i> -PRO-5a.....	47
Figura 9: Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo.....	49
Figura 10: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF.....	50
Figura 11: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos.....	52
Figura 12: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais B1RKO após OAF.....	54
Figura 13: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B2RKO.....	56
Figura 14: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a produção de VEGF em animais B1RKO submetidos a OAF.....	58
Figura 15: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais B1RKO após a OAF.....	60
Figura 16: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais B2RKO após OAF.....	62
Figura 17: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B2RKO.....	64

Figura 18: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais tratados com L-NAME após OAF.....	66
Figura 19: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais tratados com L-NAME.....	68
Figura 20: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a migração de células endoteliais (HUV. em condições de normóxia e hipóxia.....	70
Figura 21: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a proliferação de células endoteliais (HUVECs) em condições de normóxia e hipóxia.....	71
Figura 22: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos induzidos por STZ após OAF.....	73
Figura 23: Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos após OAF.....	75
Figura 24: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	77
Figura 25: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a arteriogênese <i>de novo</i> e remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	79
Figura 26: Fotomicrografias de músculos adutores isquêmicos de animais diabéticos tratados com <i>Bj</i> -PRO-7a.....	80
Figura 27: Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo.....	82
Figura 28: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF.....	83
Figura 29: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos.....	85
Figura 30: Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos após OAF.....	87
Figura 31: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	89
Figura 32: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c sobre a arteriogênese <i>de novo</i> e remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	91
Figura 33: Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais diabéticos tratados com <i>Bj</i> -PRO-10c.....	92
Figura 34: Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo.....	94
Figura 35: Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF.....	95

Figura 36: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-10c sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos.....97

Figura 37: Efeitos do tratamento com os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c sobre a glicemia sanguínea em animais diabéticos após a OAF.....99

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos *Bj*-PROs descritos para *Both jararaca*.....24

Tabela 2: Efeitos do *Bj*-PRO-5a sobre a razão de remodelamento vascular e relação parede/luz.....46

Tabela 3: Efeitos do *Bj*-PRO-7a sobre a razão de remodelamento vascular e relação parede/luz.....79

Tabela 4: Efeitos do *Bj*-PRO-10c sobre a razão de remodelamento vascular e relação parede/luz.....91

Tabela 5: Variação (Δ) entre a glicemia no 14º dia e antes do tratamento com os *Bj*-PROs.....99

Tabela 6: Resumo dos efeitos do tratamento com *Bj*-PROs em animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos submetidos à OAF.....110

Lista de abreviaturas e siglas

AGE - Produtos finais de glicação avançada
Alv - Área de luz vascular
Apv - Área de parede vascular
AsS- Argininosuccinato sintetase
Atv - Área total vascular
B1R - Receptor B1 de bradicinina
B1RKO - Animal com deleção do receptor B1
B2R - Receptor B2 de bradicinina
B2RKO - Animal com deleção do receptor B2
Bj - *Bothrops jararaca*
Bk - Bradicininina
BPP - Peptídeo potenciador de bradicinina
cGMP - monofosfato de guanosina cíclica
CPE - Célula progenitora endotelial
CTA`s – Células tronco angiogênicas
DAP - Doença arterial oclusiva periférica
EBM - Endothelial Cell Basal Medium
ECA - Enzima conversora de angiotensina
EGM-2 - Endothelial Cell Growth Medium
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
FGF - Fator de crescimento fibroblástico
H&E - Hematoxilina e Eosina
HGF - Fator de crescimento de hepatócitos
IECA - Inibidores da enzima conversora de angiotensina I
IGF-1 - Fator de Crescimento da Insulina
LDPI - Laser Doppler perfusion imaging
L-NAME - NG-nitro-Larginina metil ester
MAPK - Proteína quinase ativadora de mitógenos
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
ROS - Espécies reativas de oxigênio
OAF - Oclusão da artéria femoral
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
PROs - Oligopeptídeos ricos em prolina
SHR - Rato espontaneamente hipertenso
TGF- β - Fator de crescimento de transformação
TNF- Fator de Necrose Tumoral
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 Doença arterial periférica e Diabetes Mellitus.....	14
1.2 Neovascularização	15
1.2.1 Angiogênese	15
1.2.2 Arteriogênese.....	16
1.2.3 Vasculogênese.....	17
1.3 Sistema calcicriena-cininas e angiogênese.....	19
1.4 Angiogênese terapêutica.....	20
1.5 Oligopeptídeos ricos em prolina derivados do veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> (<i>Bj-PROs</i>).....	22
2. Justificativa.....	27
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. Materiais e Métodos.....	30
4.1 Síntese dos peptídeos.....	30
4.1.1 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	30
4.1.2 Espectrometria de massa.....	31
4.2 Animais.....	31
4.3 Modelo experimental de isquemia de membros posteriores em camundongos.....	31
4.4 Modelo de indução de diabetes por estreptozotocina.....	31
4.5 Tratamento com os <i>Bj-PROs</i>	32
4.6 Avaliação da perfusão sanguínea por imagem de perfusão por laser Doppler em animais diabéticos tratados com os <i>Bj-PROs</i>	32
4.7 Análise histológica para avaliação de angiogênese e arteriogênese.....	33
4.8 Análise Morfométrica das arteríolas.....	33
4.9 - Avaliação do perfil antigênico das células isoladas da medula óssea e do sangue por citometria de fluxo.....	34
4.10 ELISA (ensaio imunoenzimático) para detecção de VEGF.....	37
4.11 Avaliação da glicemia sanguínea.....	37
4.12 Design experimental.....	38
4.13 Metodologia <i>in vitro</i>	39
4.14 Análise estatística.....	40
5. Resultados.....	41

5.1 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais normoglicêmicos submetidos à OAF.....	41
5.2 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.....	43
5.3 Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.....	45
5.4 - Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF.....	48
5.5 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a produção de VEGF em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.....	51
5.6 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a não estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais deficientes na expressão gênica do receptor B1 de Bradicinina (B1RKO) submetidos à OAF.....	53
5.7 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a não estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B1RKO.....	55
5.8 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a não estimula a produção de VEGF em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B1RKO.....	57
5.9 - Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas em animais B1RKO após a OAF.....	59
5.10 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais deficientes na expressão gênica do receptor B2 de Bradicinina (B2RKO) submetidos à OAF.....	61
5.11 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B2RKO.....	63
5.12 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais tratados com L-NAME submetidos à OAF.....	65
5.13 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais tratados com L-NAME.....	67
5.14 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a estimula a migração e a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em condições de normóxia e hipóxia.....	69
5.15 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a não estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais hiperglicêmicos, no modelo de Diabetes Mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ).....	72
5.16 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais diabéticos submetidos à OAF.....	74
5.17 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	76

5.18 Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	78
5.19 Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF.....	81
5.20 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a não estimula a produção de VEGF em músculos de membros posteriores isquêmicos em animais diabéticos.....	84
5.21 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais diabéticos submetidos à OAF.....	86
5.22 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	88
5.23 Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos.....	90
5.24 Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF.....	93
5.25 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c não estimula a produção de VEGF em músculos de membros posteriores isquêmicos em animais diabéticos.....	96
5.26 O peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a, mas não <i>Bj</i> -PRO-10c, tem efeito na diminuição da glicemia sanguínea em animais diabéticos após a OAF.....	98
6 Discussão.....	100
7 Sumário.....	110
8 Conclusão.....	111
9 Referências Bibliográficas.....	112

1- Introdução

1.1 Doença arterial periférica e Diabetes Mellitus

A Doença arterial periférica (DAP) é um grupo de doenças caracterizadas pelo estreitamento ou oclusão das artérias, resultando em redução gradual de fornecimento do aporte sanguíneo para os membros. Pacientes com DAP podem ser assintomáticos ou podem desenvolver sintomas de claudicação intermitente (dor nos membros inferiores durante exercício físico) ou sintomas de isquemia crítica intermitente do membro, caracterizada pela dor em repouso com presença ou ausência de ulceração ou gangrena (NORGREN *et al.*, 2007). A prevalência de DAP varia entre diferentes populações em todo o mundo. Estima-se um número de 202 milhões de casos diagnosticados para DAP em todo mundo (FOWKES *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se uma prevalência de 10,5% na população geral (MAKDISSE *et al.*, 2008).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da DAP incluem tabagismo, hipertensão, doença cardíacas isquêmicas, Diabetes Mellitus (DM), dentre outros (TAVINTHARAN *et al.*, 2009; MASCARENHAS *et al.*, 2014). Em pacientes diabéticos, o grau e a duração de hiperglicemia estão associados ao aumento no risco de desenvolver DAP, bem como ao agravamento da doença (ADLER *et al.*, 2002). Althouse *et al.* (2014) estimaram que, a cada aumento de 1% de HbA1c, aumenta em 21% risco de desenvolver DAP nos 4-6 anos seguintes. Além disso, pacientes com DAP e DM têm maiores riscos de amputação de membros da extremidade inferior do que pacientes com DAP sem DM, sendo que mais de 50% de todas as amputações ocorrem em pessoas com DM. Importammente, DAP associada ao DM está fortemente relacionada com doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, contribuindo para um alto risco de morbidade e mortalidade (GOLDSTEIN *et al.*, 2006, TSAI *et al.*, 2001; JUDE *et al.*, 2001).

O DM é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia. Suas causas se baseiam tanto pela defeituosa secreção de insulina (DM Tipo I), quanto pela resistência à insulina nos órgãos periféricos (DM Tipo II). Segundo a OMS, em 2014, existiam cerca de 422 milhões de pessoas vivendo com diabetes, em comparação com 108 milhões em 1980. A prevalência global de diabetes quase dobrou desde 1980, tendo aumentado de 4,7% para 8,5% na população adulta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O DM impacta negativamente na qualidade de vida do indivíduo, diminuindo sua expectativa de vida devido a vários complicadores, como neuropatias, nefropatias e doenças cardiovasculares. A hiperglicemia e a ausência de atividade da insulina acarretam alterações metabólicas e disfunções em células

endoteliais, levando a complicações micro e macrovasculares (LUCA and OLEFSKY, 2007), TAYLOR, 1999, WU e HUAN, 2007).

Nesse contexto, em pacientes diabéticos, o excesso na produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs), leva ao aumento do estresse oxidativo e fatores inflamatórios, o que pode indiretamente ou diretamente agravar a DAP (MARSO e HIATT, 2006). AGEs são compostos formados pela interação entre grupos cetônicos (decorrentes da hiperglicemia) e proteínas plasmáticas e teciduais. A ligação de AGEs em células endoteliais, por exemplo, podem levar a alterações no funcionamento dessas células, como o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem diminuir a biodisponibilidade ou mesmo a produção de óxido nítrico (NO) pela inibição da óxido nítrico sintase (NOS), conseqüentemente, levando à disfunção endotelial (BARLOVIC *et al.*, 2011).

A DAP pode ser assintomática até atingir um estágio avançado. No DM, apresenta-se numa idade mais precoce e progride mais rapidamente do que em pacientes não diabéticos, tornando a doença mais grave. No caso de dor em repouso ou lesões tróficas, a indicação é pelo tratamento cirúrgico como, por exemplo, pela angioplastia ou enxerto. Ainda assim, se os sintomas persistirem e o fluxo continuar obstruído, o próximo passo é a amputação do membro afetado (JUDE, 2004, JUDE *et al.*, 2001). Dessa maneira, terapias baseadas na estimulação do crescimento de novos vasos sanguíneos, como tentativa de melhora na revascularização do tecido isquêmico, representam estratégia terapêutica interessante no tratamento da DAP.

1.2 – Neovascularização

1.2.1 Angiogênese

A neovascularização ocorre tanto na saúde quanto na doença. O sistema vascular tem função de penetrar em órgãos e tecidos para suprir as células locais com nutrientes e oxigênio. Para que isso aconteça, é necessário que haja formação de vasos sanguíneos. Em casos fisiológicos, a ativação da angiogênese, por exemplo, acontece na embriogênese, onde o desenvolvimento do sistema vascular é imprescindível (COULTAS *et al.*, 2005). A estrita regulação do sistema circulatório e o funcionamento equilibrado é muito importante para o organismo, ao passo que, tanto excessiva formação de vasos sanguíneos, quanto o seu desenvolvimento insuficiente pode levar a doenças graves. Por exemplo, ativação da angiogênese é uma condição necessária para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e tumores malignos. Um nódulo de tumor em expansão, como qualquer outro tecido, deve ser fornecido com oxigênio e nutrientes para manter sua atividade vital (KARAMYSHEVA *et al.*, 2007). Por outro lado, em casos de oclusão total ou parcial do fluxo sanguíneo para uma determinada área, a ineficácia da formação de novos vasos sanguíneos agrava ainda mais regiões de isquemia devido à falta de oxigenação, podendo levar, por exemplo, a infarto do miocárdio e acidente vascular

encefálico, conduzindo assim à perda tecidual. Especificamente, no caso dos membros inferiores, os casos mais graves podem resultar em amputação dos mesmos (MONCADA *et al.*, 2006).

Neste trabalho, serão abordados três conceitos sobre formação de vasos sanguíneos (Figura.1). Considera-se angiogênese, a formação de novos vasos a partir de células endoteliais diferenciadas de um capilar pré-existente (Carmeliet, 2000). A hipóxia causada pelo aporte inadequado de oxigênio, induz a liberação de citocinas como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietina, fator de transformação do crescimento (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); este último, é um importante e muito estudado estimulador da angiogênese. Porém, essa estimulação fisiológica do crescimento de novos vasos sanguíneos por angiogênese, apesar da tentativa de contribuição para o restabelecimento da perfusão sanguínea local, não consegue compensar totalmente a obstrução ocorrida, pois são capilares pequenos, com diâmetro entre 10 a 20 μ m (LAWALL *et al.*, 2010).

No indivíduo adulto, os vasos sanguíneos são quiescentes e raramente formam novos ramos. No entanto, as células endoteliais mantêm uma alta plasticidade para detectar e responder à sinais angiogênicos (JAIN, 2003). Atraídos por sinais pró-angiogênicos, as primeiras células a se separarem da parede do vaso são os pericitos, que se libertam da membrana basal por degradação proteolítica mediada por metaloproteinases (MMP's). Em seguida, as células endoteliais se tornam móveis e invasivas e projetam extensões citoplasmáticas chamadas de filopódios (SCHLINGEMANN *et al.*, 1991). A partir daí, essas células endoteliais guiam (denominadas tip cell) formam novos brotos em direção ao gradiente dos sinais pró-angiogênicos, seguidas das células endoteliais em migração (denominadas stalk cell), estabelecendo o lúmen via proliferação para suportar o alongamento do broto. Células guia se juntam com células vizinhas para formar anastomoses e, então, ampliar a rede vascular local (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000). O processo cessa a partir da diminuição dos sinais pró-angiogênicos e aumento dos sinais anti-angiogênicos quando, então, a quiescência é reestabelecida (FOLKMAN, 2003; CARMELIET, 2003).

1.2.2 Arteriogênese

1.2.2.1 Arteriogênese *de novo*

A arteriogênese, por sua vez, envolve o desenvolvimento de vasos colaterais a partir de uma rede de arteríolas pré-existent, seja por crescimento de novos vasos, seja por remodelamento de ramos colaterais. Diferentemente da angiogênese, o principal gatilho para este processo de neovascularização é o estímulo mecânico causado sobre as paredes das arteríolas pelo aumento da força de cisalhamento que ocorre após a oclusão de uma artéria de maior calibre, bem como a resposta inflamatória decorrente deste. No caso do crescimento de uma nova arteríola, este ocorre a partir da proliferação e migração de células endoteliais e/ou progenitoras endoteliais,

bem como da musculatura lisa presentes em arteríolas pré-existentes para formar um novo lúmen vascular (SCHAPER, 2012; PHNG *et al.*, 2009).

1.2.2.2 Arteriogênese por remodelamento vascular

Artérias colaterais podem aumentar o seu diâmetro pelo remodelamento de sua parede, aumentando assim a capacidade de transportar sangue para regiões isquêmicas. Esse processo arteriogênico é estimulado pela a força de cisalhamento aumentada nos vasos colaterais à artéria principal ocluída, levando a um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, o que favorece a adesão de monócitos que, posteriormente, se acumulam em volta dos vasos colaterais e secretam fatores de crescimento e citocinas (ex: VEGF, NO, proteína quimiotática de monócitos/MCP-1). Em alguns modelos experimentais, a arteriogênese endógena é capaz de restaurar quase totalmente a revascularização no tecido isquêmico induzido pelo estreitamento vascular (HEILMANN *et al.*, 2002).

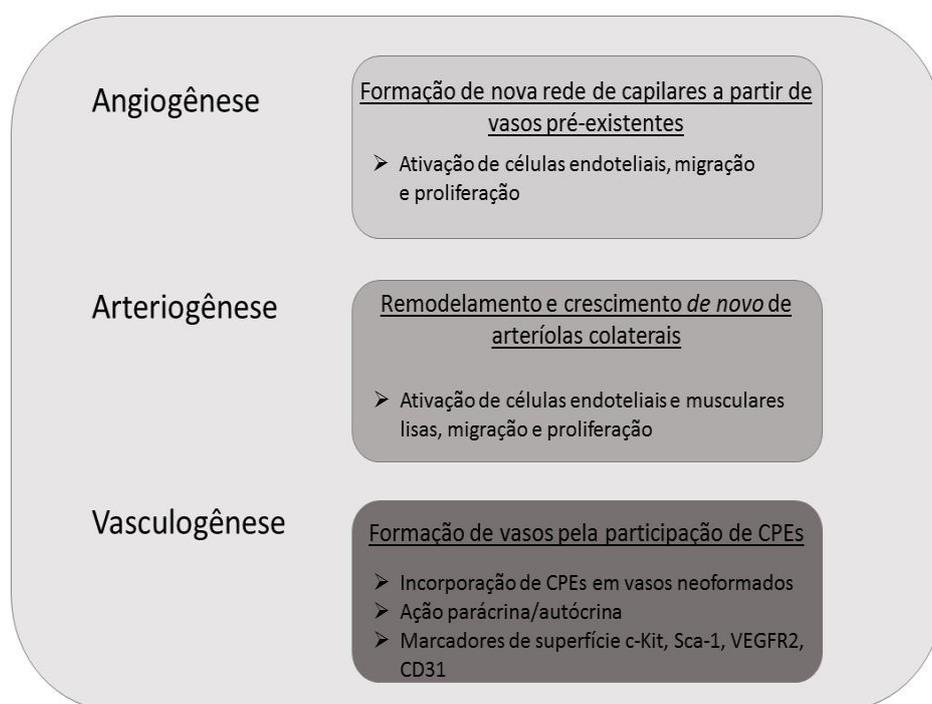


Figura 1 - Processos de formação de vasos sanguíneos: angiogênese, arteriogênese e vasculogênese

1.2.3 Vasculogênese

Além disso, novos vasos sanguíneos podem se desenvolver a partir de células progenitoras endoteliais (CPEs – no adulto) ou angioblastos (no embrião) em um processo denominado vasculogênese, o qual também pode ser estimulado por hipóxia e contribuir na revascularização pós-natal (CARMELIET *et al.*, 2003). A vasculogênese é, portanto, definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da diferenciação de células precursoras em

células endoteliais (RISAU *et al.*, 1997). Postula-se que essas células progenitoras possam desempenhar um papel importante na reparação vascular endógena após lesão vascular e na manutenção da integridade endotelial. Foi proposto que CPEs são mobilizadas de seus nichos, como a medula óssea, por exemplo, em direção à corrente sanguínea e são capazes de migrar para o tecido isquêmico, se diferenciando em células endoteliais e se incorporando em vasos pré-existentes, como também pela secreção de citocinas agindo de modo parácrino, facilitando a angiogênese (ASAHARA *et al.*, 1997). Além disso, Fang e colaboradores, sugeriram recentemente a existência de subpopulações de células-tronco progenitoras c-kit⁺ altamente angiogênicas que seriam advindas da camada endotelial dos vasos sanguíneos (FANG *et al.*, 2012).

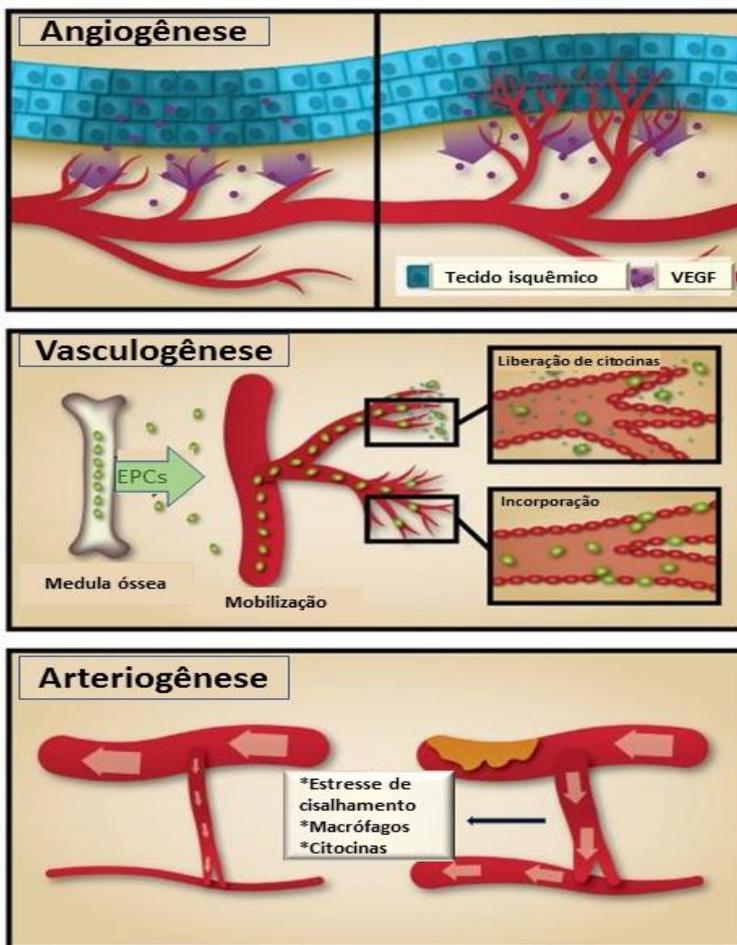


Figura 2 – Processos de neovascularização em resposta à obstrução arterial. A angiogênese se dá pela formação de novos vasos a partir de células endoteliais pré-existentes, onde fatores de crescimento como VEGF, são liberados tanto do local de hipóxia como de células endoteliais com intuito de estimular a angiogênese. Denomina-se vasculogênese, o processo de formação de novos vasos a partir de células progenitoras endoteliais (CPEs) derivadas da medula ossea, de onde são mobilizadas em direção à corrente sanguínea e são capazes de migrar para o tecido isquêmico, se incorporando em vasos pré-existentes ou liberando citocinas para estimulação da angiogênese. A arteriogênese refere-se ao desenvolvimento de

vasos colaterais a partir de uma rede de arteríolas pré-existentes, seja por crescimento de novos vasos, seja por remodelamento de ramos colaterais. O estresse de cisalhamento causado pela oclusão induz uma adesão acentuada de macrófagos em volta dos vasos colaterais, o que leva a uma produção de fatores de crescimento e citocinas que induzirão o aumento no diâmetro dos vasos. (Adaptado de Cooke e Losordo, 2015)

Em conjunto, esses três processos de neovascularização; angiogênese, arteriogênese e vasculogênese, regulados de forma adequada e integrativa, podem restabelecer a perfusão do fluxo sanguíneo em áreas isquêmicas (Figura 2). Entretanto, é importante salientar que em pacientes diabéticos a neovascularização é prejudicada, o que pode acarretar em doenças vasculares isquêmicas, devido a vários fatores incluindo a expressão insuficiente de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o óxido nítrico (NO). Desse modo, a angiogênese e arteriogênese são insuficientes para superar a diminuição do fluxo de sangue por artérias estreitadas ou ocluídas nesses pacientes (HUANG *et al.*, 2008; RISAU, 1997). Prejuízo na mobilização e nas funções de EPCs são relatadas no DM do Tipo 1. Os mecanismos propostos para tal anormalidade se baseiam, especialmente, na geração deficiente de NO e aumento no nível de estresse oxidativo (TAKAHASHI *et al.*, 1995; GALLAGHER *et al.*, 2007; FADINI *et al.*, 2006).

1.3 – Sistema calicreína-cinina e angiogênese

Os componentes-chave do sistema calicreína-cinina estão presentes no âmbito vascular, onde podem funcionar por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos. Este sistema age através de cininas que são geradas a partir de precursores, chamados de cininogênios, e de enzimas, chamadas de calicreínas (calicreína plasmática e calicreína tissular). A cinina mais importante é a Bradicininina (BK), um nonapeptídeo que se liga com alta afinidade ao receptor B2 (B2R) acoplado à proteína-G expresso em diversos tecidos e, especialmente, no endotélio vascular. A clivagem da Bradicininina em seu sítio C-terminal pela enzima cininase I (uma carboxipeptidase) resulta no peptídeo Des-Arg⁹-bradicininina, o qual se liga com alta afinidade ao receptor B1 (B1R). A expressão do receptor B1R, também acoplado à proteína-G, é induzida por mediadores inflamatórios em locais com lesão, em contraste, portanto, com o receptor B2R, que é constitutivamente expresso em vários tipos celulares. Em sequência, a enzima Cininase II degrada as cininas em fragmentos inativos; essa enzima é também conhecida como enzima conversora de angiotensina I (ECA), a enzima passo-limitante na produção de angiotensina II. Nos vasos sanguíneos, as cininas produzidas pelo endotélio ativam células endoteliais e células da musculatura lisa do vaso, promovendo a produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO),

modulando a função vascular (STONE *et al.*, 2009; LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005; HU *et al.*, 1993).

Vários trabalhos evidenciam o papel do sistema calicreína-cinina na regulação da angiogênese em diferentes modelos experimentais. Antagonistas de B1R atrasam a recuperação do fluxo sanguíneo e diminuem a densidade capilar, enquanto agonistas de B1R e B2R melhoram o fluxo nos músculos isquemiados em modelo de isquemia de membros. Do mesmo modo, agonistas de B1R e B2R têm potente efeito pró-angiogênico em animais diabéticos submetidos à isquemia de membros, através da mobilização de células-tronco angiogênicas CD34⁺/VEGFR2⁺ e infiltração de macrófagos (EMANUELI *et al.*, 2002; DESPOSITO *et al.*, 2015). Ratos que não produzem cininogênio, por exemplo, tem uma capacidade reduzida de formação de vasos sanguíneos em modelos de angiogênese inflamatória (ISORDIA-SALAS *et al.*, 2005). Além disso, camundongos *knockout* para o receptor B2R demonstraram ter uma baixa capacidade de brotamento de vasos em modelo de isquemia cardíaca (SANCHEZ *et al.*, 2008). Em modelo de isquemia de membros, animais *knockout* para calicreína tissular apresentaram reduzida capacidade angiogênica quando comparado a animais *wild-type* (WT) (STONE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2004). Além disso, Krankel *et al.* (2008) mostraram que a sinalização B2R/BK é importante para a mobilização de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea (EPCs, do inglês *endothelial progenitors cells*) para tecidos isquêmicos, sendo que o comprometimento da sinalização de B2R contribui para um recrutamento reduzido de EPCs para o local de isquemia, levando a uma diminuição da recuperação do fluxo sanguíneo em modelo de isquemia de membros posteriores em camundongos. Esses efeitos foram associados à redução de NO, um conhecido mediador de angiogênese.

Dentre as classes mais populares de drogas que tem ação no sistema cardiovascular, estão os inibidores de ECA (iECA), são utilizados como anti-hipertensivos pela sua capacidade de inibir a geração de angiotensina II bem como pela ação na estabilização das cininas (CLOZEL *et al.*, 1989; SILVESTRE *et al.*, 2001). Interessantemente, tem sido demonstrado que os iECA podem estimular a revascularização de tecidos isquêmicos em modelos experimentais, efeitos esses mediados via receptores de cininas e estimulação de NO (SILVESTRE, *et al.*, 2001; EBRAHIMIAN *et al.*, 2004).

1.4 Angiogênese terapêutica

A importância da angiogênese despertou esperanças de que a manipulação deste processo poderia oferecer oportunidades terapêuticas em casos de doenças isquêmicas (FOLKMAN, 2006). O termo angiogênese terapêutica vem sendo usado desde 1993, sendo que seu objetivo primário é favorecer a indução de formação de novos vasos para suprirem tecidos isquêmicos (Di Stefano *et al.*, 2004; ISNER *et al.*, 1999). Nas últimas décadas, uma variedade de moléculas

sinalizadoras pró e anti-angiogênicas foram descritas/desenvolvidas para o tratamento de diversas anormalidades ex: tumores, distúrbios oculares e doenças isquêmicas (ISNER e ASAHARA, 1999). Devido ao número reduzido de alternativas para o tratamento de doenças isquêmicas, a estratégia terapêutica baseada no crescimento vascular, seja por estimulação do desenvolvimento e remodelamento de vasos colaterais ou de novos capilares, é uma alternativa que vem sendo largamente estudada. A estimulação da angiogênese pode se dar de várias maneiras, induzida por hipóxia, fatores de crescimento, citocinas, óxido nítrico (NO) que, substancialmente, estimulam o processo angiogênico (COLLINSON *et al.*, 2004).

Existem, basicamente, três modalidades da angiogênese terapêutica: a terapia gênica, a terapia celular e a terapia farmacológica (BARANDON, 2004, LUYT, 2003). A terapia gênica vem sendo considerada uma estratégia importante por possuir diversas vantagens, como por exemplo a possibilidade de entregar o gene terapêutico apenas no tecido hipóxico, sem aumentar sua concentração sistêmica. Porém, alguns estudos demonstraram a ineficácia e efeitos colaterais com a utilização de vetores com genes angiogênicos. O gene da proteína VEGF vem sendo um dos mais estudados (GROCHOT-PRZECZEK, DULAK, JOZKOWICZ, 2013).

A terapia utilizando esse gene demonstrou ser capaz de aumentar parcialmente a perfusão tecidual e o crescimento de vasos colaterais em coelhos e camundongos submetidos à isquemia de membro (JOZKOWICZ *et al.*, 2003; ROGUIN *et al.*, 2003). Entretanto, foi observado edema e um crescimento exacerbado de capilares como efeito colateral quando da utilização do gene de VEGF (VAJANTO *et al.*, 2002). Em estudos pré-clínicos, demonstrou-se que a terapia com o gene de Fator de crescimento de hepatócitos (HGF) regula positivamente a perfusão sanguínea em condições de hipóxia, pela indução de arteriogênese em modelo experimental de coelho (MORISHITA *et al.*, 1999, HAYASHI *et al.*, 1999). A terapia celular se baseia no transplante de células-tronco. Por exemplo, o transplante de células-tronco angiogênicas da medula óssea pode atuar através da formação direta de vasos ou, de forma indireta, por meio da secreção parácrina de fatores pró-angiogênicos, promovendo assim, a neovascularização reparadora. Vários estudos vêm demonstrando de forma cada vez mais consistente que células originadas na medula óssea participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular. Por exemplo, o número de células endoteliais progenitoras circulantes aumenta em resposta à isquemia e são atraídas para os sítios de lesão em isquemia de membro inferior e miocárdio (MADEDDU, 2005, COLLINSON & DONNELLY, 2004). Em modelo animal de isquemia de membros, a injeção de células-tronco mesenquimais e de células-tronco hematopoiéticas estimulou o aumento do fluxo sanguíneo local e densidade capilar em animais diabéticos e não-diabéticos (TATENO *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2012). A administração terapêutica de células-tronco não deve ser atribuída apenas as células-tronco derivadas da medula óssea, mas também derivadas do tecido adiposo, (KINNAIRD *et al.*, 2004; ZHI *et al.*, 2014), cordão umbilical (PRATHER *et*

al., 2009, BILIC *et al.*, 2008) e outras fontes que também são capazes de reparação em processos isquêmicos (PRATAMA *et al.*, 2011).

A terapia farmacológica se baseia na administração local ou sistêmica de fatores de crescimentos ou de substâncias que induzam a liberação de fatores de crescimento pró-angiogênicos, sendo que seu objetivo primário é favorecer a indução de formação de novos vasos para suprirem os tecidos isquêmicos. Várias substâncias têm sido sugeridas como importantes agentes na indução e ou manutenção da angiogênese, tais como: o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF), o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF) e o Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF-1) (CARMELIET and TESSIER-LAVIGNE, 2005, TROIDL *et al.*, 2010). Estudos recentes sugerem que a angiotensina II e inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs) estimulam a angiogênese e a melhora da revascularização do tecido isquêmico (SILVESTRE and LÉVY, 2004; FALLAHZADEH *et al.*, 2011). Corroborando esse efeito terapêutico, vários trabalhos sugerem o possível envolvimento dos receptores B1 e B2 de bradicinina sobre a estimulação da produção de mediadores pró-angiogênicos (como VEGF e NO), aumento da densidade capilar local e proliferação de células endoteliais como possíveis mecanismos angiogênicos dos iECAs (GOHLKE *et al.*, 1997; FABRE *et al.*, 1999; MORBIDELLI *et al.*, 1996).

A angiogênese terapêutica, portanto, tem como objetivo final a recuperação do membro afetado através da estimulação da revascularização do mesmo (COLLINSON *et al.*, 2004) e representa uma nova abordagem para o tratamento de doenças vasculares isquêmicas crônicas, podendo ser usada para pacientes que não têm condições de revascularização cirúrgica.

1.5 Oligopeptídeos ricos em prolina derivados do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Bj-PROs)

A função primordial dos venenos das serpentes é de imobilizar suas presas para garantir sua alimentação. O estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e a caracterização molecular de toxinas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Bj) resultou em muitas contribuições científicas de grande relevância, dentre elas destacam-se: a descoberta da bradicinina (BK) (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949) e o isolamento dos primeiros peptídeos ricos em prolina potenciadores de bradicinina (BPPs – do inglês *bradykinin potentiating peptides*) sintetizados na glândula de veneno (FERREIRA, 1970), cuja ação sinérgica é capaz de promover uma acentuada queda na pressão arterial das presas.

Além de potencializar os efeitos da BK, os primeiros BPPs identificados foram capazes de inibir a ação catalítica da ECA (FERREIRA *et al.*, 1970b; STEWART *et al.*, 1971). Basicamente, a atividade da ECA resulta na conversão da angiotensina I em angiotensina II (vasoconstritor), bem como na degradação da BK (vasodilatador), peptídeos de ações antagônicas que desempenham papel fundamental no controle da pressão da arterial. A ação inibitória dos

BPPs sobre a ECA despertou grande interesse clínico-farmacêutico que culminou no desenvolvimento de um inibidor sítio dirigido da ECA, o Captopril. Este, que foi o primeiro inibidor sintético da ECA, foi desenvolvido baseado na estrutura dos BPPs sendo largamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial humana desde o início da década de 80 (CUSHMAN *et al.*, 1977).

Antigamente denominados como BPPs, os oligopeptídeos ricos em prolina (PROs – do inglês *proline-rich-oligopeptides*) são moléculas peptídicas compostas de 5 a 17 resíduos de aminoácidos. As características estruturais comuns dos PROs isolados da *Bothrops jararaca* (*Bj*) incluem: i) a presença dos aminoácidos ácido piroglutâmico e prolina nas posições N- e C-terminais, respectivamente; ii) a maioria dos *Bj*-PROs apresentam a sequência tripeptídica isoleucina-prolina-prolina na porção C-terminal; iii) alto conteúdo de prolina (FERREIRA *et al.*, 1970; IANZER *et al.*, 2004; ZELANIS *et al.*, 2010).

A identificação de novas seqüências de *Bj*-PROs no veneno bruto (IANZER *et al.*, 2004) e nos cDNAs que codificam a proteína precursora do peptídeo natriurético tipo C na glândula de veneno e no cérebro da *Bothrops jararaca* (MURAYAMA *et al.*, 1997; HAYASHI *et al.*, 2003) renovou o interesse por esta família de moléculas. Até o momento, foram identificados 30 seqüências de *Bj*-PROs para serpente *Bothrops jararaca* (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos *Bj*-PROs descritos para *Bothrops jararaca*.

(N-t)=N-terminal e (C-t)=C-terminal, <E=ácido piroglutâmico.

Sequência de aminoácidos	Nomenclatura	PM (Da)
<EKWAP	<i>Bj</i> -PRO-5a ^{a, c, d, e}	611,7
<EWPRP	<i>Bj</i> -PRO-5b ^e	665,8
<ESWPGP	<i>Bj</i> -PRO-6a ^{a, e}	653,7
<ENWPRP	<i>Bj</i> -PRO-10b cleaved ^f	779,4
<ENWPRP	<i>Bj</i> -PRO-10c cleaved ^f	760,3
<EDGPIPP	<i>Bj</i> -PRO-7a ^e	705,8
<EWPRPTP	<i>Bj</i> -PRO-11a cleaved ^f	863,4
<EWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-9a ^{a,b, e}	1101,3
<ESWPGPNIPP	<i>Bj</i> -PRO-10a ^{a,b,c, e, g}	1075,2
<ENWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10b ^{b, e, g}	1215,4
<ENWPHPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10c ^{a, b, c, d, e}	1196,3
<EQWAQNWPHPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10c +<EQWA(N-t) ^g	1709,5
<EWPRPTPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-11a ^{b, e}	1299,5
<EGRAPGPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11b ^{c, e}	1069,2
<EGRAPHPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11c ^c	1149,3
<EGRPPGPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11d ^e	1025,3
<EARPPHPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11e ^d	1189,4
<EARPPHPPIAP	<i>Bj</i> -PRO-11e +AP(C-t) ^g	1357,7
<EARPPHPPIAPL	<i>Bj</i> -PRO-11e +APL(C-t) ^g	1470,6
<EQWAQARPPHPPIPPAP	<i>Bj</i> -PRO-11e+<EQWA(N-t),AP(C-	1870,5
<EGHAWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12a ^{a, e}	1415,6
<EWGRPPGPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-12b ^d	1281,5
<EWAQWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12c ^{e, g}	1485,8
<ELGPPPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12d ^g	1279,8
<EGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a ^{d, e, g}	1370,5
<EGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a -<EG(N-t) ^g	1202,6
<EWAQGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a +<EWA(N-t) ^g	1756,6
<EQWAQGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a +<EQWA(N-t) ^g	1884,5
<EGGLPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13b ^{a,b, c, d, e}	1297,5
<EWAQWPRPTPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-14a ^{e,f}	1683,8

^a (Ferreira *et al.*, 1970); ^b (Ondetti *et al.*, 1971); ^c (Murayama *et al.*, 1997); ^d (Hayashi *et al.*, 2003); ^e (Ianzer *et al.*, 2004); ^f (Pimenta *et al.*, 2007); ^g (Zelanis *et al.*, 2010).

A ação anti-hipertensiva demonstrada na década de 70 foi atribuída à capacidade dos BPPs de inibir a atividade catalítica da ECA. Entretanto, a capacidade de alguns novos peptídeos dessa família em potencializar o efeito da BK não é diretamente proporcional à sua eficiência para inibir a ECA, como demonstrado tanto em experimentos *ex vivo* como *in vivo* (COTTON *et al.*, 2002; HAYASHI *et al.*, 2003; IANZER *et al.*, 2007; IANZER *et al.*, 2011), sugerindo possíveis outros mecanismos exercidos pelos Bj-PROs que permanecem desconhecidos.

Dentre os Bj-PROs com efeitos anti-hipertensivos, mas com baixa eficiência em inibir ECA, podemos citar os peptídeos Bj-PRO-5a, Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c, os quais foram selecionados para utilização neste trabalho.

O peptídeo Bj-PRO-5a possui efeito anti-hipertensivo de longa duração em animais experimentais. Apesar desse peptídeo ser considerado um agente potenciador de BK, sua afinidade pelo sítio C-terminal de ECA, sítio este mais eficiente para inibir ECA, é fraca, sugerindo que existam outros mecanismos responsáveis pela sua ação anti-hipertensiva. Interessantemente, foi demonstrado que a vasodilatação induzida por Bj-PRO-5a é mediado pela ativação de B2R e receptores M1 (mAChR) de acetilcolina. Além disso, esses receptores interferem nos efeitos anti-hipertensivos induzidos por Bj-PRO-5a, dependentemente da produção de NO. (MORAIS *et al.*, 2011).

O peptídeo Bj-PRO-7a, por sua vez, é um fraco inibidor de ECA *in vitro* e fraco potenciador da BK *ex vivo*, porém, provocou queda significativa na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo que a sua ação anti-hipertensiva não esteja relacionada com a inibição de ECA. Um estudo *in vitro* sugere que o Bj-PRO-7a é agonista no receptor muscarínico M1 (NEGRAES *et al.*, 2011).

Já o peptídeo Bj-PRO-10c, embora tenha a capacidade de inibir seletivamente o sítio C-terminal da ECA *in vitro* (HAYASHI *et al.*, 2003), teve seu efeito anti-hipertensivo em ratos SHR observado em doses inferiores àquelas necessárias à inibição da ECA *in vivo* (IANZER *et al.*, 2007). Outra demonstração de que o mecanismo de ação do Bj-PRO-10c é independente da inibição da ECA foi obtida em estudos de biodistribuição e biotransformação. O Bj-PRO-10c tem uma lenta absorção e seu acúmulo foi observado principalmente nos rins, mesmo quando co-administrado com doses elevadas de Captopril, sugerindo que esse peptídeo possui um alvo renal não relacionado à ECA (SILVA *et al.*, 2008). Interessantemente, Guerreiro *et al.* (2009) mostraram que o Bj-PRO-10c interage com a enzima argininosuccinato (AsS) nos rins, ativando-a e, conseqüentemente, aumentando a produção de NO. A AsS é enzima passo limitante no ciclo arginina-cutrulina, sendo responsável pela reciclagem da L-arginina, substrato para produção de

óxido nítrico (NO) (SOLOMONSON *et al.*, 2003), que, por sua vez, é uma importante molécula pró-angiogênica (PHNG e GERHARDT, 2009).

Dessa maneira, em consequência aos potentes efeitos anti-hipertensivos observados *in vivo* e a identificação de novos alvos (IANZER *et al.*, 2007; LAMEU *et al.*, 2010; PRADO, 2013), hipotetizamos que os *Bj*-PROs recentemente descritos, em especial o *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e o *Bj*-PRO-10c, possam ser possíveis moléculas com atividade pró-angiogênica e, conseqüentemente, estimulem a revascularização do tecido isquêmico em animais diabéticos. De fato, em trabalho realizado por nosso grupo (PRADO, 2013), demonstramos que os peptídeos *Bj*-PROs 7a e 10c possuem efeitos pró-angiogênicos no modelo de oclusão da artéria femoral em camundongos saudáveis. Em particular, o *Bj*-PRO-10c têm efeitos associados ao aumento dos níveis dos mediadores pró-angiogênicos VEGF e NO, bem como à mobilização de células angiogênicas da medula óssea.

Dessa forma, a exploração farmacológica das funções pró-angiogênicas dos *Bj*-PROs pode ser útil no tratamento de doenças isquêmicas.

2- JUSTIFICATIVA

A doença arterial periférica (DAP) se caracteriza pela redução do fluxo sanguíneo de membros inferiores e conseqüente ameaça à viabilidade destes (OURIEL, 2001). Pacientes com isquemia de membros inferiores que não respondem à terapia medicamentosa padrão ou não possuem indicação para procedimentos endovasculares ou cirúrgicos de reperfusão podem sofrer amputação dos membros afetados (O'HARE, *et al.*, 2006). O diabetes é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da DAP. A capacidade que o corpo possui para desenvolver novos vasos colaterais frente a doenças oclusivas vasculares, é uma resposta adaptativa espontânea dos tecidos importante para determinar, em parte, a gravidade da isquemia residual. Dentre várias razões pelas quais os sintomas clínicos de isquemia grave é piorado em pacientes diabéticos, está relacionado o fraco desenvolvimento de circulação colateral em regiões isquemiadas, diminuição da expressão de VEGF na musculatura isquemiada e uma reduzida capacidade de mobilização e diferenciação de células progenitoras endoteliais (CPE's) na medula óssea, todos esses fatores contribuindo para um déficit na neovascularização (Beckman *et al.*, 2002; RIVARD *et al.*, 1999; TAMARAT *et al.*, 2004).

A angiogênese terapêutica é uma abordagem que vem sendo estudada para melhorar a perfusão tecidual e desfecho clínico de pacientes com doenças isquêmicas. A angiogênese é o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e desempenha um papel importante em condições fisiológicas e patológicas (FOLKMAN, 2006). Estudos experimentais e clínicos demonstram que o processo angiogênico é alterado em estados diabéticos e que a alteração da microvasculatura no músculo esquelético no decurso do diabetes pode ocasionar isquemia que, por sua vez, pode resultar em ulceração e amputação do membro afetado (SHEETZ *et al.*, 2002; SILVESTRE e LÉVY, 2006).

Sabe-se que inibidores da enzima conversora de angiotensina I (iECAs), amplamente utilizados como agentes anti-hipertensivos, como, por exemplo, o Captopril, desenvolvido com base na estrutura dos *Bj*-PROs (ONDETTI *et al.*, 1981), não apenas inibem a conversão de angiotensina I em angiotensina II como também bloqueiam a degradação da bradicinina em fragmentos inativos (LINZ *et al.*, 1995). As cininas, ao se ligar aos seus receptores B1R e B2R, medeiam a regulação da angiogênese via liberação de NO, sendo capazes de estimular a proliferação de células endoteliais (MORBIDELLI *et al.*, 1998), bem como estimular a angiogênese em modelo de implante de esponjas (HU, 1993) e na isquemia de membros posteriores em camundongos (KRANKEL *et al.*, 2008).

Em conseqüência aos potentes efeitos anti-hipertensivos observados *in vivo*, seus possíveis efeitos pró-angiogênicos e a identificação de novos alvos (IANZER *et al.*, 2007; LAMEU *et al.*, 2010; PRADO, 2013), hipotetizamos que os *Bj*-PROs recentemente descritos, em

especial o *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e o *Bj*-PRO-10c, possam ser possíveis moléculas que promovam uma maior atividade angiogênica e, conseqüentemente, estimulem a revascularização do tecido isquêmico em animais diabéticos. Os *Bj*-PROs representam importantes ferramentas farmacológicas tornando-os protótipos para o desenvolvimento de novas drogas (HAYASHI e CAMARGO, 2005). A exploração farmacológica das funções pró-angiogênicas dos *Bj*-PROs pode ser útil no tratamento de doenças isquêmicas.

Em meu trabalho de mestrado, realizado no laboratório de Angiogênese e células-tronco, observamos que os peptídeos *Bj*-PRO-7a e 10c têm efeito pró-angiogênico e promovem a revascularização de membros posteriores por aumento da angiogênese e da arteriogênese em camundongos sadios (normoglicêmicos) (PRADO, 2013). Perante isso, nosso objetivo no doutorado foi avaliar se esses mesmos *Bj*-PROs possuem efeito terapêutico em modelo pré-clínico de DAP associada ao Diabetes e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos. Além disso, avaliamos também os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a tanto em condições de normoglicemia quanto de hiperglicemia.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral: Avaliar o potencial terapêutico de peptídeos ricos em prolina do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Bj-PROs) sobre a revascularização de membros posteriores isquêmicos em camundongos C57/Bl6 normoglicêmicos e hiperglicêmicos submetidos à oclusão permanente da artéria femoral (OAF).

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 – Estudar os efeitos do peptídeo Bj-PRO-5a na isquemia de membros posteriores em animais normoglicêmicos através da avaliação de:

3.2.1.1 - Recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos;

3.2.1.2 - Angiogênese e arteriogênese nos músculos isquêmicos;

3.2.1.3 - Conteúdo de células tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e no sangue;

3.2.1.4 - Produção de VEGF nos músculos isquêmicos;

3.2.1.5 - Efeitos in vitro em condições de normóxia e de hipóxia, sobre a proliferação e a migração de células endoteliais

3.2.1.6 - Papel dos receptores B1 e B2 de Bradicinina e da enzima óxido nítrico sintase (NOS) como possíveis mecanismos de ação;

3.2.2 - Avaliar os efeitos do peptídeo Bj-PRO-5a na isquemia de membros posteriores em animais hiperglicêmicos através da avaliação da recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos.

3.2.3 - Estudar os efeitos dos peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c na isquemia de membros posteriores em animais hiperglicêmicos (modelo experimental de indução de DM1 por estreptozotocina) através da avaliação de:

3.2.3.1 - Recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos;

3.2.3.2 - Angiogênese e arteriogênese nos músculos isquêmicos desses animais;

3.2.3.3 - Conteúdo de células tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e no sangue;

3.2.3.4 - Produção de VEGF nos músculos isquêmicos;

3.2.3.5 - Tolerância à glicose e glicemia plasmática desses animais.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos peptídeos

A síntese de peptídeos foi feita através da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) com emprego da estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila) (FIELDS and NOBLE, 1990). Foram sintetizados os seguintes peptídeos: *Bj*-PRO-5a Pyr1-Lys2-Trp3-Ala4-Pro5-OH; *Bj*-PRO-7a - Pyr1-Asp2-Gly3-Pro4-Ile5-Pro6-Pro7-OH; *Bj*-PRO-10c- Pyr1-Asn2-Trp3-Pro4-His5-Pro6-Gln7-Ile8-Pro9-Pro10-OH. Para início da síntese, o grupo Fmoc do primeiro resíduo de aminoácido, ligado à resina, Fmoc-Pro-2-CITrt, foi removido com solução 20% de piperidina em dimetilformamida. A próxima etapa foi o acoplamento do próximo aminoácido, utilizando agentes acoplantes adequados. A reação de acoplamento durou 2 horas, e após esta etapa, foi reiniciado o ciclo seguinte, até o final do alongamento da seqüência pretendida. Para separação (clivagem) do peptídeo da resina foi utilizado tratamento com 95% de ácido trifluoroacético (TFA) e mais uma mistura de diferentes tipos de supressores de reações colaterais por cerca de 2 horas. Para extração do peptídeo da resina foi utilizado solução 5% de ácido acético diluído em água e o filtrado obtido foi liofilizado, com obtenção de um pó branco amorfo. Este foi caracterizado e purificado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), tendo sua seqüência confirmada por espectrometria de massa.

4.1.1 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para a purificação dos peptídeos foi utilizada coluna semi-preparativa C-18/Shimadzu (20 x 250mm/15µm Ultrasphere ODS) em sistema de HPLC semi preparativo em gradiente de 10 a 70% de solvente B por 40 min, fluxo de 7 - 10ml/min, monitorado em 214nm. O material eluído da purificação foi analisado por espectrometria de massa e sistema de HPLC, e apenas as frações que apresentaram teor de pureza acima de 95% foram utilizadas. Para a caracterização dos peptídeos sintéticos foi utilizada coluna analítica C-18/Beckman (4,6 x 250mm/ 5µm Ultrasphere ODS) em sistema de HPLC analítico em gradiente de 5 a 90% de solvente B por 30 min, fluxo de 1ml/min, monitorado em 214nm. Solvente A: 0,1% TFA / H₂O. Solvente B: 0,1% TFA / 90% acetonitrila (ACN) / H₂O.

4.1.2 Espectrometria de massa

Os peptídeos sintéticos foram analisados por espectrometria de massa utilizando o aparelho MALDI-TOF (Ettan MALDI-TOF, GE Heathcare). As amostras dos peptídeos foram dissolvidas em água destilada, aproximadamente 1mg/ml (peso seco). Foram misturados 2 microlitros da solução do peptídeo com 2 microlitros da matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e 2 microlitros desta mistura foram colocados no amostrador e analisados. Os espectros foram obtidos em modo Reflectron (+10 KV), voltagem de operação 20 KV, supressão 500 AMU, voltagem do detector 1700 V, 5 tiros de laser por segundos.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 8 a 12 semanas, obtidos do centro de bioterismo (CEBIO) da UFMG e animais geneticamente deficientes para o receptor B1 e B2 de bradicinina (cedidos pelo Prof. Mauro M. Teixeira do laboratório de Imunofarmacologia do departamento de Bioquímica e Imunologia - UFMG). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso à ração e água. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA - UFMG), números de protocolos 253/08 e 264/14.

4.3 Modelo experimental de isquemia de membros posteriores em camundongos

O modelo experimental de isquemia de membros posteriores utilizado foi o modelo de oclusão unilateral permanente da artéria femoral, efetuado de acordo com o descrito por Maddedu e colaboradores (2006). Para o procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados com Ketamina/ Xilazina (8 mg/Kg e 60 mg/Kg, respectivamente) por via intraperitoneal e submetidos à tricotomia e à assepsia da região inguinal do membro inferior esquerdo. A artéria femoral esquerda foi exposta, amarrada (com fio de sutura de seda 6-0) com dois nós, um proximal e outro distal à bifurcação da artéria femoral profunda e superficial, e a região entre os nós foi eletrocoagulada. As incisões foram suturadas com fio de sutura de seda 4-0.

4.4 Modelo de indução de diabetes por estreptozotocina

A indução do diabetes por estreptozotocina foi realizada segundo o protocolo descrito por Barcelos e colaboradores (2009). Brevemente, camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade receberam por cinco dias consecutivos doses de 50mg/kg de estreptozotocina via intraperitoneal

para indução do diabetes. Quatorze dias após a última dose, foi realizada medida de glicosúria (presença de glicose na urina) utilizando-se fitas reagentes (Dagnos) e os animais que apresentavam glicosúria foram selecionados para os experimentos. Apenas animais com glicosúria acima de 300 mg/dl foram incluídos na experimentação.

4.5 Tratamento com os *Bj*-PROs

Para avaliar os efeitos dos peptídeos *Bj*-PROs usamos a seguinte estratégia terapêutica: o tratamento com os peptídeos *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c, na dose de 71 nmol/Kg, foi iniciado 30min após a OAF por via intra-peritoneal e foi repetido a cada 24 horas até o dia da eutanásia dos animais. Essa dose foi escolhida por ter sido demonstrado ser a menor dose necessária para causar queda na pressão arterial em animais SHR (IANZER *et al.*, 2007).

4.6 Avaliação da perfusão sanguínea por imagem de perfusão por laser Doppler em animais diabéticos tratados com os *Bj*-PROs

Os camundongos foram anestesiados como descrito anteriormente e tiveram os pêlos da região inguinal dos membros posteriores removidos com o auxílio de um barbeador elétrico. Estes foram então colocados sobre uma plataforma de aquecimento por 5 minutos, para mantê-los em uma temperatura constante. A técnica de imagem de perfusão por laser Doppler (Moor Instruments, Ltd., England) foi usada para estimar o fluxo de sangue nos membros posteriores antes e imediatamente após a oclusão da artéria femoral (OAF), e nos dias 5, 7 e 14 após a OAF. O Laser Doppler é uma técnica que permite a visualização não-invasiva (e sem contato físico) da circulação sanguínea a partir da emissão de um laser monocromático, o qual é disperso pelas hemácias em movimento. O fluxo de sangue é estimado a partir de mudanças na frequência do laser, que é proporcional à velocidade das hemácias. Quando o procedimento de escaneamento dos membros posteriores é finalizado, a perfusão do tecido é codificada em um mapa de cores. Pouca ou nenhuma perfusão será apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão em vermelho. Após a digitalização, as imagens são analisadas utilizando-se o software Moor LDI Laser Doppler 5.3 para quantificar o fluxo sanguíneo. Os resultados foram obtidos a partir da razão do fluxo no membro isquêmico pelo fluxo no membro contralateral não isquêmico.

4.7 Análise histológica para avaliação de angiogênese e arteriogênese

A avaliação de angiogênese e arteriogênese foram realizadas através de análise histológica dos músculos adutores isquêmicos. Para isso, os camundongos foram sacrificados, 14 dias após OAF, através da infusão pelo ventrículo esquerdo de uma solução de heparina diluída em PBS (1:100) seguida de uma solução de formalina 10%, permitindo a perfusão e fixação dos vasos sanguíneos nos músculos dos membros posteriores. Em seguida, os músculos adutores foram coletados e fixados em uma solução de formalina 10%. Após um período mínimo de 24 horas de fixação, as amostras foram submetidas a etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes histológicos dos tecidos, com 5 µm de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina, e visualizados sob microscópio óptico, sob um aumento de 1.000x, para contagem de fibras musculares, capilares e arteríolas. Os critérios morfológicos para identificação dos capilares foi baseado na visualização de seu pequeno diâmetro, única camada de células endoteliais, citoplasma delgado e pelo seu núcleo na periferia. Enquanto as arteríolas foram identificadas pelo seu calibre relativamente maior do que os capilares, núcleos das células endoteliais na camada interna, presença de túnica media espessa composta por musculatura lisa. As densidades de miócitos e capilares foram calculadas através da contagem em 20 campos aleatórios, e a densidade de arteríolas foi realizada pela contagem em todo o tecido, e expressa em número de vasos/mm² de tecido.

4.8 Análise Morfométrica das arteríolas

Com o uso de um microscópio (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digital (VK-C150, Hitachi, Japão), fez-se a captura de imagens de cortes histológicos de músculos adutores dos membros inferiores de camundongos normoglicêmicos e hiperglicêmicos, coletados 14 dias após OAF, corados com Hematoxilina e Eosina, para a avaliação morfométrica de arteríolas. Estas imagens foram analisadas utilizando o programa específico Image Pro Plus. Para captura das imagens foram utilizadas as objetivas de 40x e 100x, de modo que a ampliação final real na tela do monitor (13") foi igual a 126x e 1260x, respectivamente. Todas as imagens obtidas foram na resolução de 640x480 pixels.

Devido à forma elíptica dos vasos, foi necessário calcular a média dos maiores e menores diâmetros de cada arteríola para obtermos as áreas da secção transversal do vaso e da luz vascular, e para calcularmos indiretamente a medida da área de parede do vaso. Foram utilizados 2 diâmetros para o cálculo da área total vascular (AT_v), sendo estes o maior e o menor diâmetros da elipse, que vão do limite da lâmina elástica externa (divisão entre as camadas adventícia e média) de um lado ao lado oposto do vaso. Em seguida, após a obtenção da média dos diâmetros,

fez-se a divisão do diâmetro por 2 para obtenção do raio (r) do vaso, para que assim, pudéssemos calcular a área do círculo com a fórmula: $A = \pi \cdot r^2$. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da área da luz, mas os diâmetros se limitavam de um bordo ao outro oposto do endotélio vascular. As duas áreas foram calculadas isoladamente, obtendo-se uma área total vascular (ATv), que contém a área de parede somada à área de luz vascular (ALv). A área de parede (APv), contendo as camadas média e íntima, foi determinada pela diferença entre as duas áreas (Atv-ALv). A razão de remodelamento se dá pela razão entre a área total vascular dos animais tratados, pela área total da pata contra-lateral dos animais controle (PBS). Os valores acima de 1 indicam remodelamento positivo, e os valores abaixo de 1 indicam remodelamento negativo. A relação parede/luz se dá pela razão entre a área de parede pela a área interna (ou área de luz)

4.9 - Avaliação do perfil antigênico das células isoladas da medula óssea e do sangue por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo permite identificar diferentes subpopulações de células através da sua morfologia, volume, granulosidade e marcação com anticorpos específicos para a proteína de interesse. A citometria de fluxo é uma técnica que permite a caracterização do perfil fenotípico de células em suspensão, orientadas em um fluxo laminar e interceptadas por um feixe de laser. O feixe de laser incide sobre cada célula e a radiação incidente sofre desvios que são identificados por fotosensores. Esses fotosensores podem avaliar a granulosidade intracelular através da dispersão da luz, o tamanho da célula através da difração e refração da luz, bem como a fluorescência emitida por um fluoróforo acoplado a um anticorpo eventualmente ligado à superfície celular (Nüsse *et al.*, 1997).

Foram avaliadas populações de células com potencial angiogênico no sangue e na medula óssea de camundongos normoglicêmicos e hiperglicêmicos, 3 dias após estes serem submetidos à OAF. Foram utilizados um número de 5 a 6 animais por grupo. Para o isolamento das células do sangue periférico, usamos 1 ml de sangue diluído em 2ml de PBS 1x EDTA, que foi lavado 2 vezes em 15 ml da solução de lise de hemácias, ACK (NH₄Cl 8.29 g/L; KHCO₃ 1.00 g/L; EDTA disodium •2H₂O). Para o isolamento das células da medula óssea, foi realizado lavado medular com 3 ml de PBS 1x EDTA, seguido de duas lavagens com 15 ml de ACK. As lavagens com ACK foram de 5 minutos, agitando suavemente, e então as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1.200 rpm, à 4°C. Após a última lavagem, o excesso de ACK foi retirado das amostras com uma lavagem com PBS 1x EDTA, e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1.200 rpm, à 4°C. O pellet de células formado foi ressuspensionado em 1 ml de PBS 0,5% soro fetal bovino (SFB) e as mesmas foram contadas e plaqueadas na concentração de 200.000 células por poço, em uma placa de 96 poços com fundo em U. Posteriormente, foram adicionados anticorpos para

marcação das seguintes proteínas de superfície específicas: anti-Linhagem marcado com APC, anti-Sca-1 marcado com FITC, anti-c-Kit marcado com PerCP-Cy5.5, anti-VEGFR2 marcado com PE, anti-CD31 marcado com PE-Cy7, anti-CXCR4 marcado com APCCy7 (todos da BD Pharmigen). Foram adicionados 20µl porpoço dos anticorpos citados, diluídos na concentração de 1µl/100µl do diluente FACS buffer (PBS, 0.5-1% BSA). Além disso, os seguintes anticorpos controle de isotipo foram utilizados: IgG2a-APC, IgG1-FITC, IgG2a-FITC, IgG2a-PE, IgG2a-PE-Cy7 e IgG2b-PerCP-Cy5.5 (todos da BD Pharmigen. A placa foi incubada por 30 minutos, a 4°C (protegidas contra a luz) e então lavadas com 200µl de PBS1x, seguida de centrifugação por 7 minutos, 300g à 4°C, e o descarte do sobrenadante (esse procedimento foi realizado 2 vezes). Finalmente, as células foram fixadas com 200µl de solução formaldeído 4% (Synth) e transferidas para tubos de FACS para posterior leitura em equipamento BDFACS Canto II Flow cytometer (São José, USA com o auxílio do programa FACS Diva.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJo, versão 7.6.3 (EUA). Os resultados foram expressos pela porcentagem de células positivas para cada anticorpo específico.

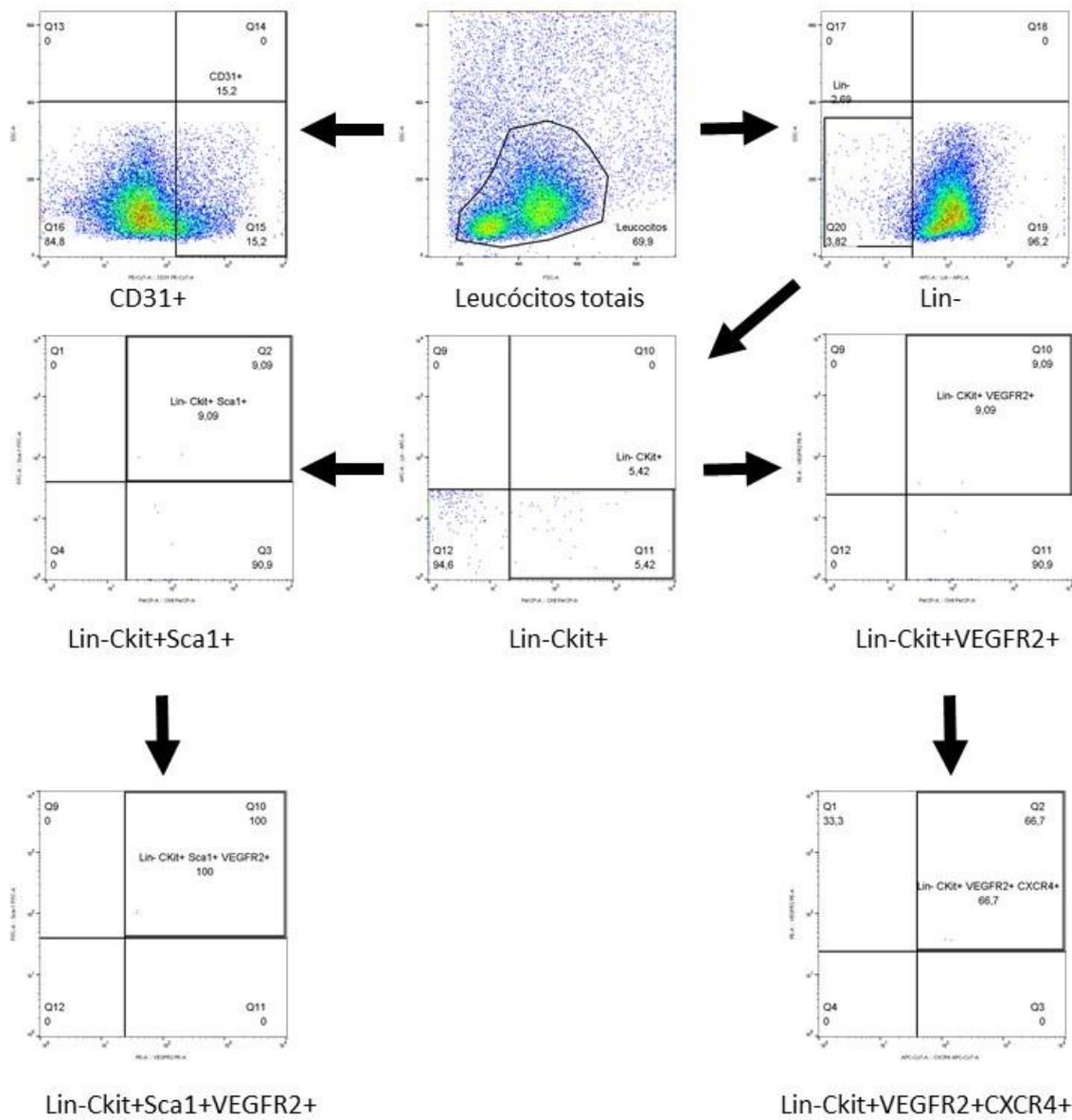


Figura 3: Imagens representativas da estratégia de “gating” utilizada para análise das populações de CTAs por citometria de fluxo. As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa Flow-Jo.

4.10 – ELISA (ensaio imunoenzimático) para detecção de VEGF

Os músculos gastrocnêmios das patas isquêmicas e contra-laterais de camundongos normoglicêmicos e hiperglicêmicos, foram coletados 3 dias após OAF e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior análise. A expressão da citocina VEGF no tecido foi dosada usando kit da R&D Systems, seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, as amostras foram previamente pesadas e homogeneizadas em uma solução de PBS contendo inibidores de protease (1 mL de solução para cada 100 mg de tecido). Em seguida, foram adicionadas em duplicata a uma placa de 96 poços que já continha o anticorpo monoclonal específico para VEGF, previamente aderido mesma, e incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte, foi adicionado um anticorpo secundário de detecção biotilado à cada poço e deixado por 2h incubando à temperatura ambiente, O mesmo foi então lavado com PBS, em seguida foi adicionada uma solução de estreptoavidina-HRP após 20 minutos de incubação. Finalmente, uma solução contendo o substrato (solução de peróxido de hidrogênio a 0,006% e 0,4 mg/mL de OPD em tampão citrato pH 5,0) foi adicionada aos poços e deixada para reagir com as amostras durante 20 minutos. Esta reação foi interrompida pelo acréscimo de ácido sulfúrico à 2 M, e a intensidade da cor foi quantificada por densidade óptica à 540 nm em leitor espectrofotômetro de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos como pictogramas (pg) de citocina por mg de peso úmido de músculo.

4.11 – Avaliação da glicemia sanguínea

Para mensuração da glicose plasmática, o sangue periférico foi coletado através de um pequeno corte na ponta da cauda do animal, não anestesiado, e utilizou-se um glicosímetro convencional e fitas reagentes. O sangue foi coletado antes da OAF, 7 e 14 dias após a OAF, sendo (no caso das amostras de 7 e 14 dias) coletado 12h após o tratamento com os peptídeos *Bj-PROs* e com os animais alimentados. Os resultados foram representados como miligramas por decilitro (mg/dl).

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG) foi adaptado de Schreyer e colaboradores (1998). Os animais foram submetidos a jejum de 12h. Pela manhã, foi injetado uma solução de 25% de glicose diluída em salina 0,9% estéril nos animais, em uma dose final de 2 g de glicose/kg, via intraperitoneal. A glicemia foi avaliada no sangue periférico nos intervalos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção da solução de glicose, através de um pequeno corte na ponta da cauda do animal não anestesiado, utilizando um glicosímetro convencional.

4.12 Design experimental

Para avaliar os efeitos dos *Bj*-PROs usamos o seguinte esquema terapêutico: o tratamento com os peptídeos *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c na dose de 71 nmol/Kg (IANZER *et al.*, 2007) foi iniciado 30min após a OAF por via intra-peritoneal e foi repetido a cada 24 horas até o dia da eutanásia dos animais que ocorreu no 3º e/ou no 14º dia pós-OAF. Os animais do grupo controle receberam injeções (i.p.) diárias de 100µl de PBS (solução veículo). Antes da OAF, foi avaliada a glicemia dos animais e avaliado o fluxo sanguíneo por imagem por Laser Doppler. Imediatamente após a cirurgia, avaliamos o fluxo sanguíneo e iniciamos o tratamento. Considerando que o dia 0 é o dia que a OAF é realizada, avaliamos o fluxo sanguíneo nos dias 3, 5, 7, 10 e 14 após a OAF. Os animais foram eutanasiados no 14º dia para a coleta do sangue e dos músculos adutores para análise histológica. Num segundo momento, os animais foram eutanasiados no 3º dia para a coleta dos músculos adutores isquemiados, sangue e medula óssea (Figura 4).

Para os experimentos de inibição da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o inibidor não específico de NOS, L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil ester – Sigma) foi utilizado na dose de 20 mg/kg por dia (BERNÁTOVÁ *et al.*, 2010) via intra-peritoneal. O tratamento com L-NAME se iniciou 24h antes da OAF e foi repetido a cada 24 horas até o dia da eutanásia dos animais que ocorreu no 14º dia pós-OAF. Os animais do grupo controle receberam injeções (i.p.) diárias de 100 µl de PBS (solução veículo).

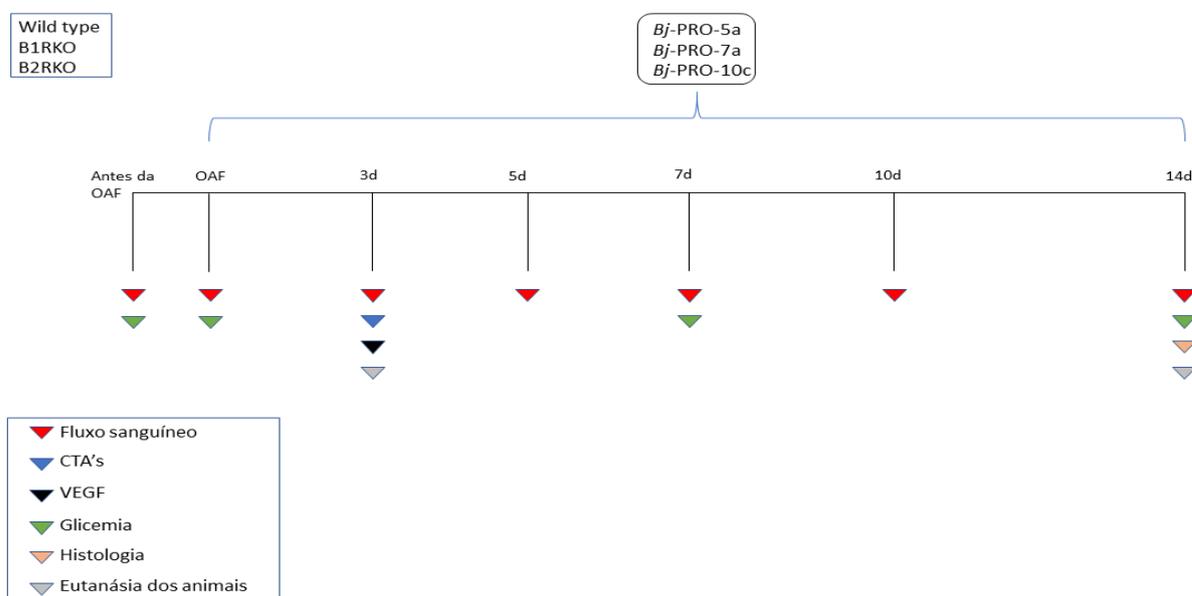


Figura 4: Esquema representativo do desenho experimental

4.13 Metodologia *in vitro*

Para avaliar o potencial de migração de células endoteliais da veia umbilical humanas (HUVECs) após o tratamento com o peptídeo *Bj*-PRO-5a, e em condições de normóxia e hipóxia (utilizando uma câmara de hipóxia BioSpherix – PROOXC21 para manter as células à 1% de oxigênio), foi utilizado o ensaio de migração “scratch wound assay”. Para isso, as células foram plaqueadas por poço, em placas de 48 poços, e mantidas em meio EGM-2 suplementado com 10% de SFB, bem como fatores de crescimento e citocinas presentes em kit comercial específico para células endoteliais (Lonza, Suíça). As HUVECs foram mantidas em cultura por 12 horas, à 37°C e 5% CO₂, para formação de uma monocamada celular. No dia seguinte, foi feita uma ruptura linear nesta monocamada celular, com o auxílio de uma ponteira estéril. As células foram então lavadas com PBS 1X e tratadas com o peptídeo *Bj*-PRO-5a (100nM) diluído em meio de cultura EBM2 contendo 0,1% de SFB, na presença do inibidor de proliferação, hidroxiureia, à 2mM. Foram ainda feitos poços de controle experimental contendo apenas o veículo ou contendo meio EBM suplementado com 10% SFB (controle positivo) cujas células foram incubadas nas mesmas condições dos grupos tratados. O fechamento da ranhura nas monocamadas celulares foram acompanhadas por 36 horas, sendo que as células foram visualizadas e fotografadas imediatamente após a execução da ranhura e ao final do tempo experimental, com o auxílio de microscópio invertido. A quantificação da migração celular foi feita através do cálculo da porcentagem de fechamento da ruptura da monocamada celular, realizados à partir da medida da área livre de células inicial e ao fim do experimento, usando o programa Image Pró-Plus.

Para avaliação dos efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a proliferação de HUVECs, xxxc células foram plaqueadas por poço, em placa de 96 poços, e mantidas à 37°C e 5% CO₂, por 12 horas. Subsequentemente, as células foram tratadas com o peptídeo na dose de 100nM, diluído em meio EBM2 contendo 0,1% de SFB durante 24 horas. Foram ainda feitos poços de controle experimental contendo apenas o veículo ou contendo meio EBM suplementado com 10% SFB (controle positivo) cujas células foram incubadas nas mesmas condições dos grupos tratados. O ensaio de proliferação foi realizado utilizando o kit Cell Proliferation ELISA BrdU Colorimetric (Roche Applied Science, Basel, Suíça), seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, BrdU foi adicionado às células e estas foram incubadas à 37°C e 5% CO₂, durante 24 horas. Após este tempo as células foram fixadas baseado na solução fixing do kit utilizado e o DNA desnaturado através da adição do reagente FixDenat. Em seguida foi adicionado anticorpo anti-BrdU POD, que ligou-se ao BrdU incorporado no DNA celular recentemente sintetizado, e quantificados através da medição de absorbância 450nm à 690nm por espectrofotometria.

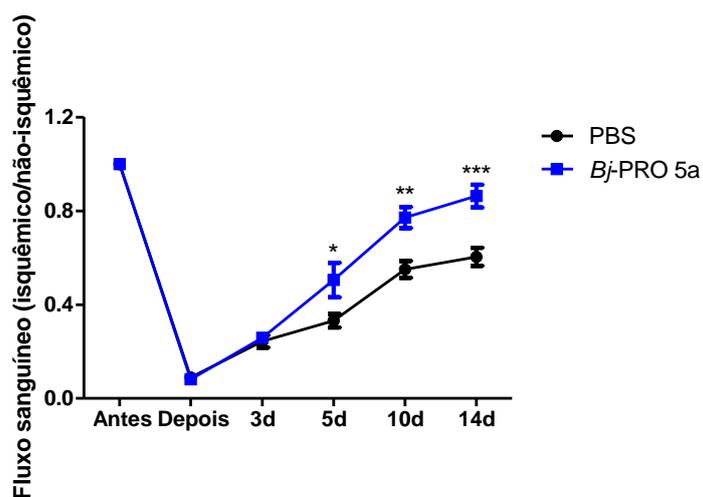
4.13 Análise estatística

A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student, quando os dados consistiram de apenas dois grupos, e por análise de variância (ANOVA), quando foram comparados três ou mais grupos. Quando a ANOVA indicou significância, os dados foram analisados utilizando o pós-teste *Newman Keuls* para comparação entre os grupos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5- RESULTADOS

5.1 O peptídeo *Bj-PRO-5a* estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais normoglicêmicos submetidos à OAF

Para avaliarmos o efeito do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais normoglicêmicos submetidos a oclusão da artéria femoral (OAF), utilizamos a técnica de imagem de perfusão por laser Doppler – LDPI (da expressão inglesa *Laser Doppler perfusion imaging*). Observamos que o fluxo foi aumentado no grupo tratado com *Bj-PRO-5a* em relação ao grupo controle no 5º dia (* $p < 0,05$ PBS 0.331 ± 0.028 ; *Bj-PRO-5a* 0.505 ± 0.073) 10º dia (** $p < 0,01$ PBS $0.550, \pm 0.035$; *Bj-PRO-5a* $0.771, \pm 0.044$) e 14º dia (** $p < 0,001$ PBS $0.603, \pm 0.038$; *Bj-PRO-5a* $0.863, \pm 0.048$) após a OAF (Figura 5).

A**B**

PBS

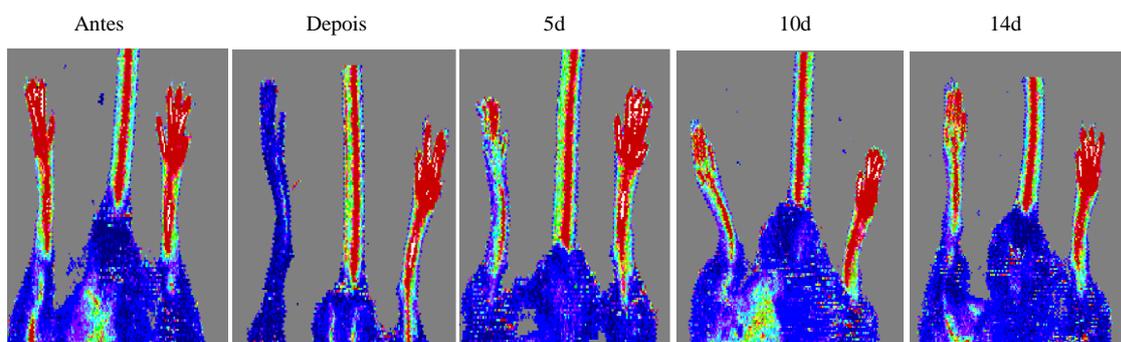
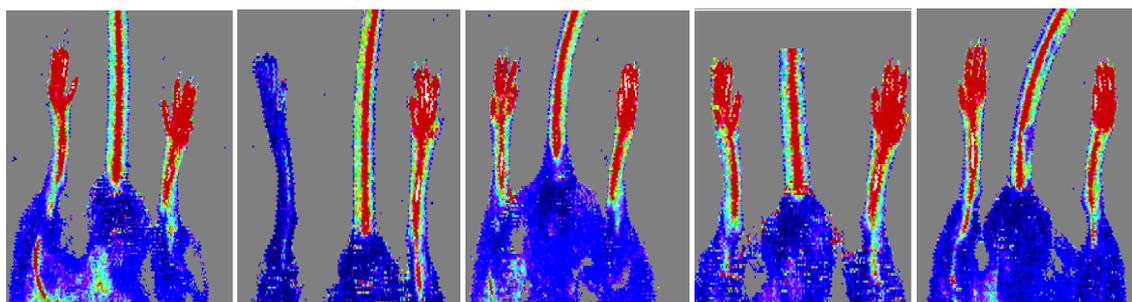
*Bj*-PRO-5a

Figura 5: Efeito do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais normoglicêmicos após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por imagem de perfusão por laser Doppler (LDPI) nos animais controle (PBS) e nos animais tratados com *Bj*-PRO-5a. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente após a OAF e nos dias 5, 10 e 14 após a OAF e tratamento diário com *Bj*-PRO-5a (71nmol/kg). Pouca ou nenhuma perfusão está apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão na cor vermelha. Os dados representam a média \pm E.P.M., n=7/grupo, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 comparado com PBS veículo. O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni.

5.2 O peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos.

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na angiogênese, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj*-PRO-5a, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e processados para análises histomorfométricas de cortes corados por H&E. Para isso, foi quantificado o número de capilares e de miócitos por mm². Observamos que houve um aumento significativo na densidade de capilares (* $p < 0,05$ PBS 2495, $\pm 170,2$; *Bj*-PRO-5a 2978, $\pm 88,28$), na relação capilar/miócito (* $p < 0,05$ PBS 1,099, $\pm 0,009182$; *Bj*-PRO-5a 1,170, $\pm 0,02884$), mas não na densidade de miócitos (PBS 2268, $\pm 143,6$; *Bj*-PRO-5a 2504, $\pm 111,6$), nos animais tratados com o *Bj*-PRO-5a em relação aos animais que receberam PBS veículo. Nos cortes corados com H&E, as células musculares apresentaram-se com o núcleo periférico e não foram observadas alterações como necrose ou a ocorrência de edema (Figura 6)

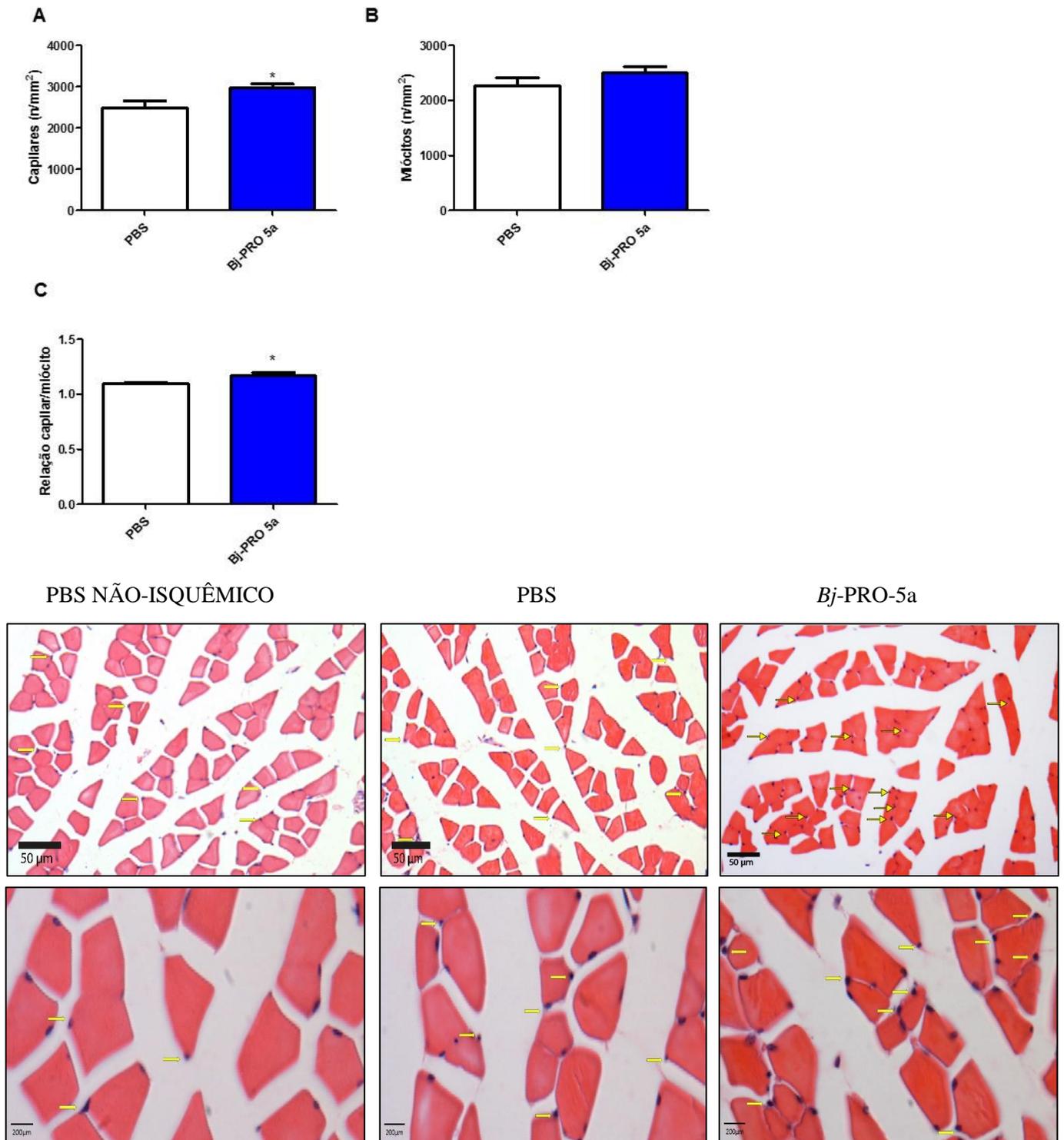


Figura 6: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de miócitos no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=5$ /grupo, $*p<0,05$ comparado com veículo PBS. (D) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS veículo ou *Bj-PRO-5a*. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x-barra escala – 50 µm e 1000x-barra escala 200 µm).

5.3 Efeito do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos

A arteriogênese pode se dá pelo desenvolvimento de novos vasos colaterais a partir de uma rede de arteríolas pré-existentes, denominada como arteriogênese *de novo*, ou por remodelamento vascular de ramos arteriais colaterais (SCHAPER & TROIL, 2012).

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* na arteriogênese *de novo*, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj-PRO-5a*, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e foi quantificado o número de arteríolas por mm². Observamos um aumento significativo na densidade de arteríolas dos músculos isquemiados de animais tratados com *Bj-PRO-5a* em relação ao controle PBS (* $p < 0,05$ PBS $5,200 \pm 0,5831$, *Bj-PRO-5a* $8,000 \pm 0,7071$).

Ao avaliarmos o remodelamento vascular nas arteríolas dos músculos adutores dos membros isquemiados, observamos que não houve diferença significativa na área de luz (PBS $128,4 \pm 10,54$, *Bj-PRO-5a* $146,8 \pm 15,72$), na área de parede (PBS $238,0 \pm 18,14$, *Bj-PRO-5a* $196,1 \pm 6,396$) e na área vascular total (PBS $366,4 \pm 25,20$, *Bj-PRO-5a* $343,7 \pm 15,58$) nos músculos dos animais tratados com *Bj-PRO-5a* em comparação com o grupo controle PBS. (Figura 7). A tabela 2 representa a razão de remodelamento e relação parede/luz, respectivamente, entre os grupos estudados.

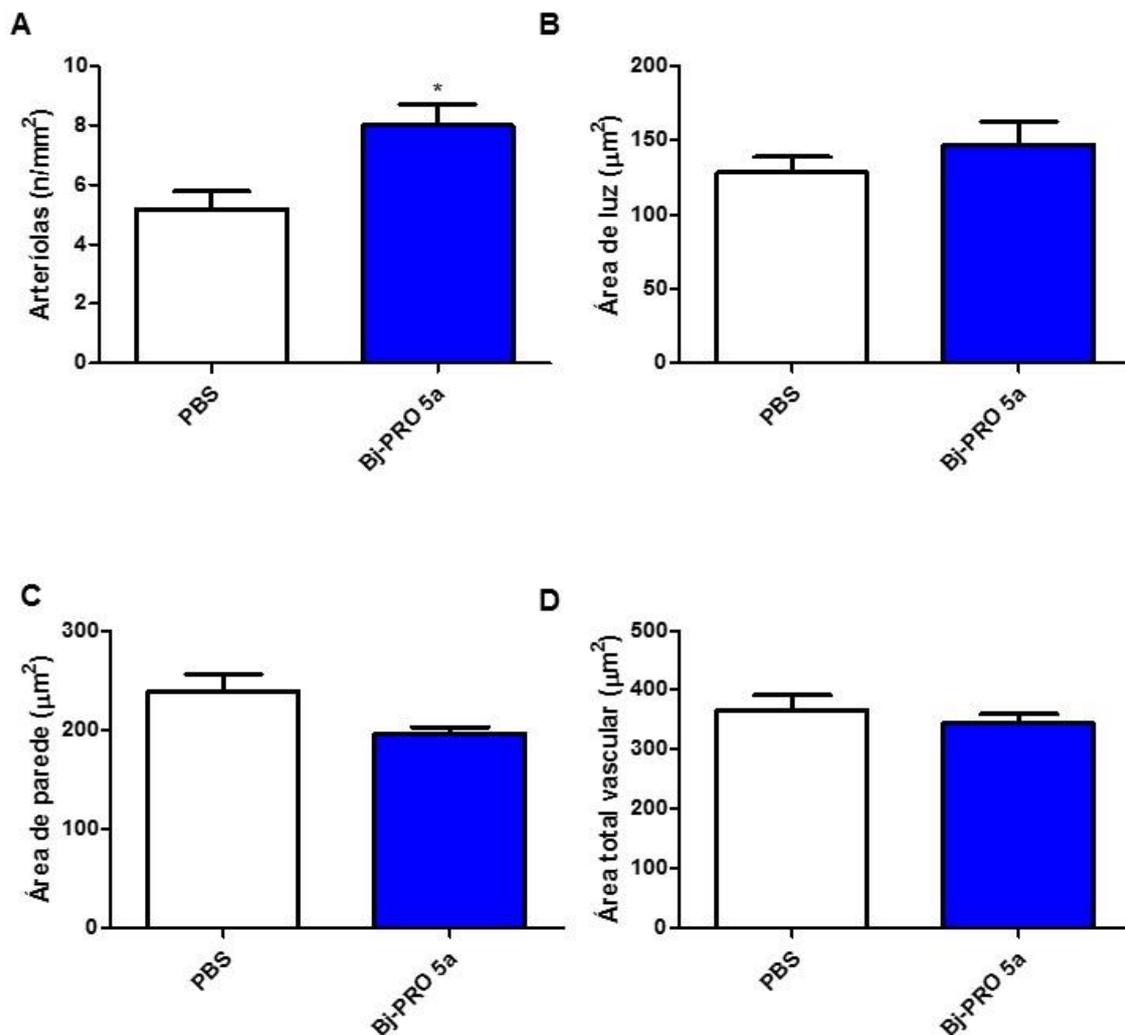


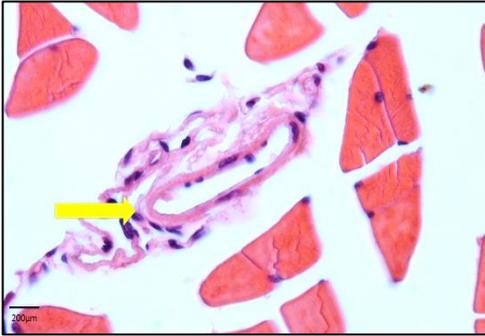
Tabela 2:

GRUPO	Razão de remodelamento	Relação parede/luz
SHAM	--	1,842
PBS	1,40	2,182
<i>Bj</i> -PRO-5a	1,36	1,577

Dados expressos em média

Figura 7: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a arteriogênese *de novo* e por remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos. (A) Densidade de arteríolas, (B) área da luz vascular, (C) área de parede vascular e (D) área total vascular no músculo adutor isquemiado no 14º dia após a OAF. Tabela 2 expressa a razão de remodelamento e a relação parede/luz. A razão de remodelamento se dá pela razão entre a área total vascular dos animais tratados, pela área total da pata contra-lateral dos animais controle (PBS). Os dados representam a média ± e.p.m., n=5/grupo, *p<0,05 comparado com veículo PBS.

PBS



***Bj*-PRO-5a**

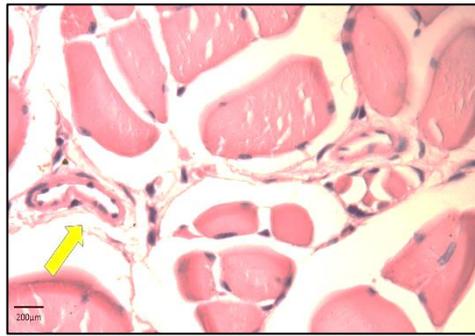


Figura 8: Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS e *Bj*-PRO-5a. As setas indicam arteríolas entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 1000x, barra escala – 200 μm).

5.4 - Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF

A formação de novos vasos sanguíneos pode ocorrer também por vasculogênese, que se define pela formação de novos sanguíneos por meio da diferenciação de células endoteliais maduras a partir de CTAs derivadas da medula óssea. As CTAs podem ser caracterizadas por marcadores de membrana específicos, que vão desde seus precursores comuns como células-tronco hematopoiéticas (CTH), as chamadas células LSK (Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺), até a presença de marcadores endoteliais como VEGFR2, CD31, etc (RAFII *et al.*, 2002; BELTRAMI *et al.*, 2003).

Para avaliar os efeitos do *Bj-PRO-5a* sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas (CTAs) após a OAF, avaliamos a frequência dessas células na medula óssea e no sangue no 3º dia pela técnica de citometria de fluxo. Nossos dados mostram que o *Bj-PRO-5a* não teve efeito sobre a frequência de células LSK (Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺), precursores de CTAs e CTHs, na medula óssea (PBS 0,2420 ± 0,02767 , *Bj-PRO-5a* 0,2512 ± 0,01796) ou no sangue (PBS 0,01859 ± 0,004699, *Bj-PRO-5a* 0,01566 ± 0,002933). Porém, quando avaliamos os efeitos do tratamento com *Bj-PRO-5a* sobre a população de CTA LSK⁻VEGFR2⁺, observamos um aumento na frequência dessas células tanto na medula óssea (**p<0,01 PBS 0,07347 ± 0,01170, *Bj-PRO-5a* 0,1543 ± 0,02002) quanto no sangue (*p<0,05 PBS 0,006883 ± 0,0005441, *Bj-PRO-5a* 0,01149 ± 0,002464). Além disso, o tratamento com *Bj-PRO-5a* aumentou a frequência no sangue das CTAs que expressam o receptor CXCR4 (Lin⁻ckit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺), um marcador de mobilização (*p<0,05 PBS 0,01217 ± 0,001488, *Bj-PRO-5a* 0,02164 ± 0,003136), mas não observamos efeito na medula óssea nessas células (PBS 0,1108 ± 0,02574 , *Bj-PRO-5a* 0,2172 ± 0,02046) (Figura 10).

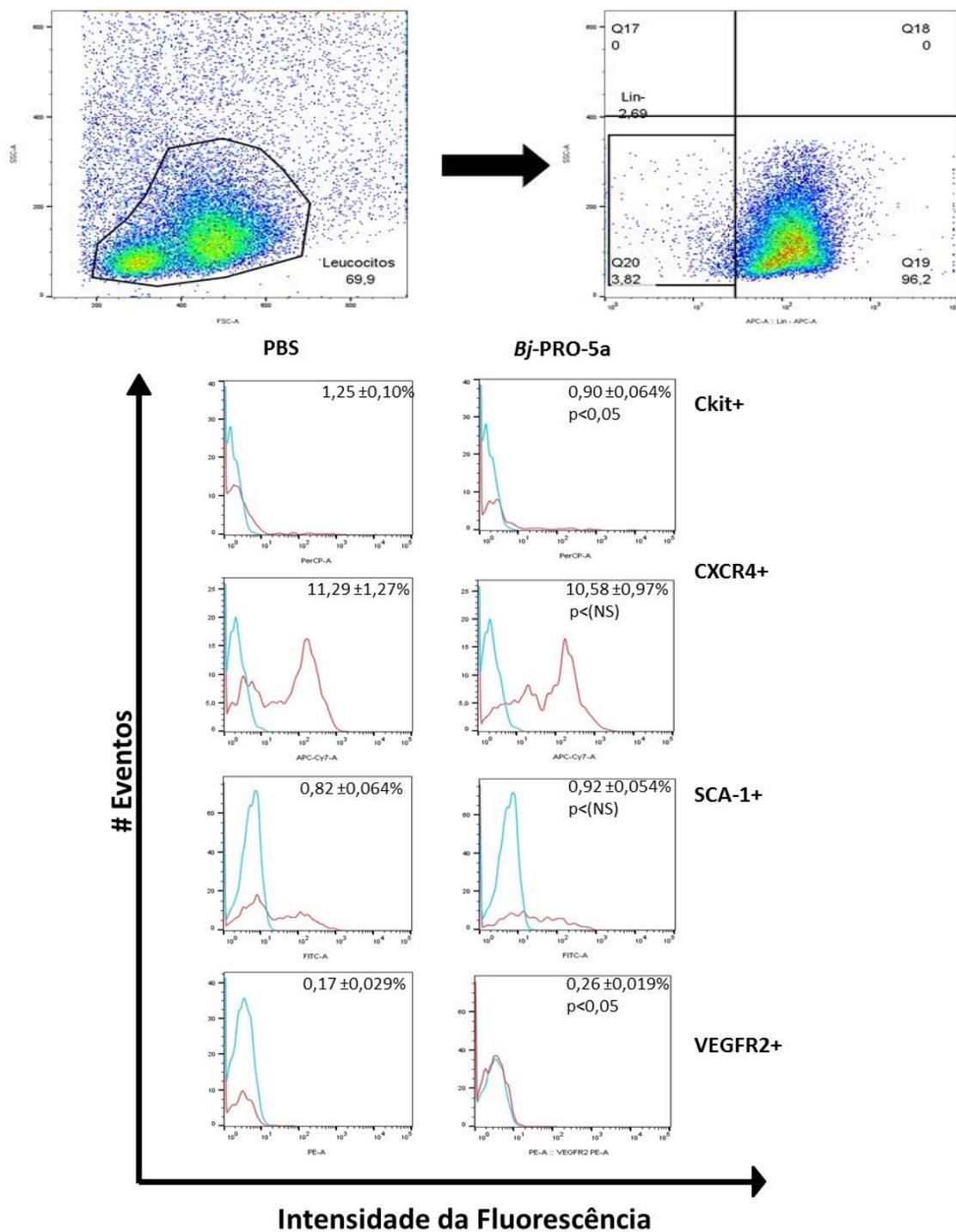


Figura 9: - Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo. (A) População de CTAs. (B) População de células negativas para marcadores de linhagem hematopoietica (Lin-). (C) Populações presentes dentre a população de CTAs, em vermelho representa o isótipo controle e em azul o marcador específico.

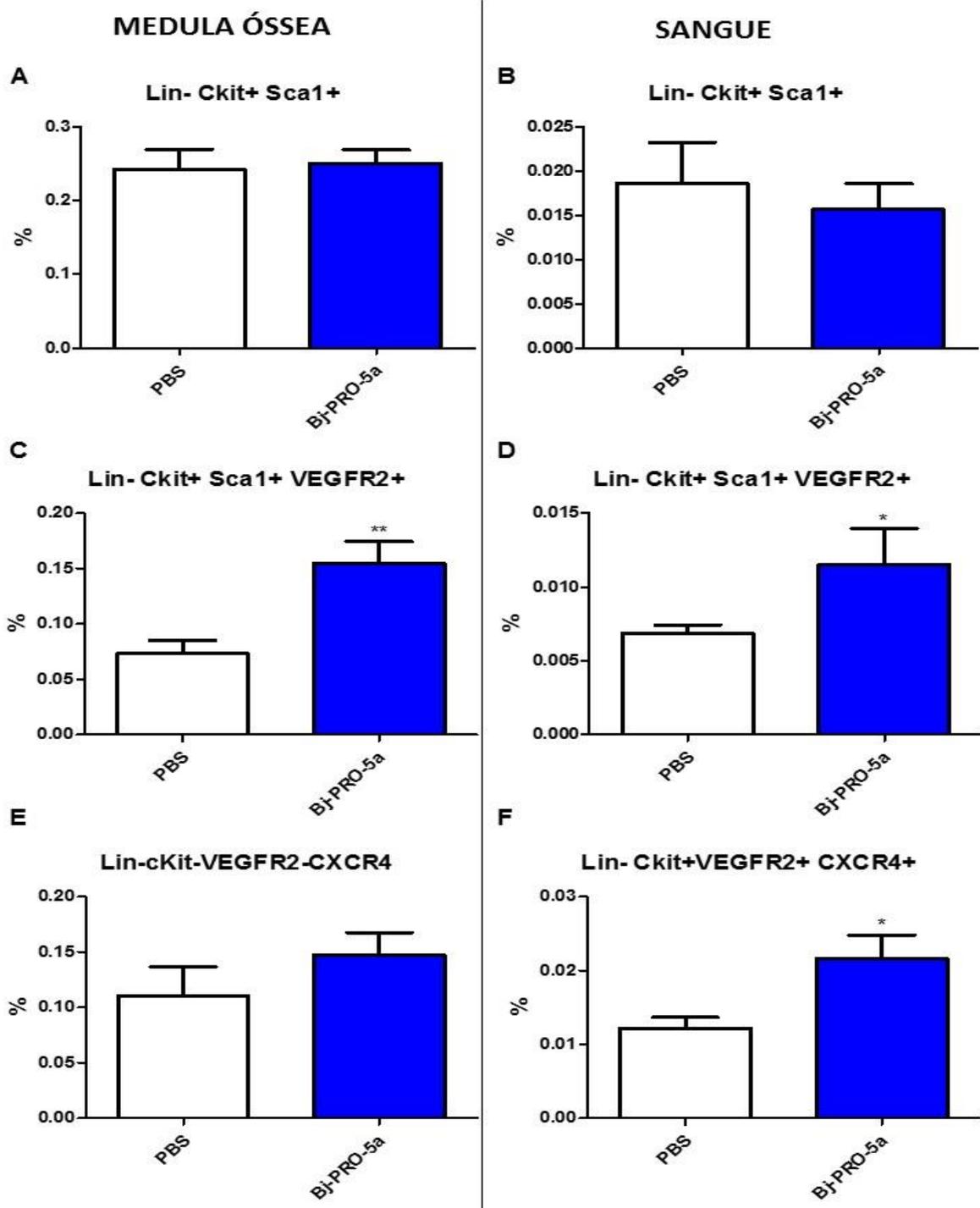


Figura 10: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF. Citometria de fluxo de células da medula óssea e do sangue periférico no 3º dia após OAF. As células foram marcadas com anticorpos específicos contra marcadores de superfície presentes em células progenitoras com potencial angiogênico. (A-B) LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺), (C-D) LSK-VEGFR2⁺, (E-F) Lin⁻c-kit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺. Os valores estão representados como porcentagem de células encontradas ±e.p.m., n=7/grupo, *p<0.05 (Teste t de Student); de animais tratados com *Bj-PRO-5a* em relação aos animais controles tratados com veículo PBS.

5.5 O peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a produção de VEGF em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais normoglicêmicos

O VEGF é uma citocina potente e multifuncional que atua no endotélio vascular causando aumento da permeabilidade vascular e estímulo à neovascularização em processos fisiológicos e patológicos (LAWALL, et a., 2010).

Assim, avaliamos os efeitos do *Bj*-PRO-5a nos níveis de VEGF através da técnica de ELISA, no músculo adutor coletado no 3º dia após a OAF, com intuito de investigar possíveis mediadores dos efeitos pró-angiogênicos induzidos pelo *Bj*-PRO-5a. Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo nos níveis de VEGF no músculo (* $p < 0,05$ PBS 358,1, $\pm 37,97$; *Bj*-PRO-5a 522,9, $\pm 51,27$) nos animais tratados com *Bj*-PRO-5a em relação ao controle PBS. (Figura 11).

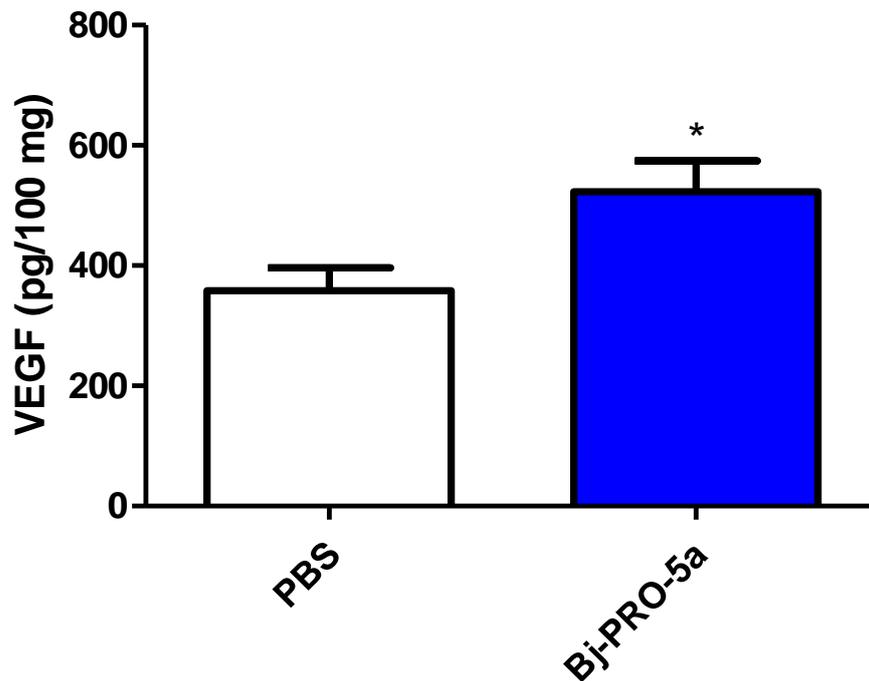
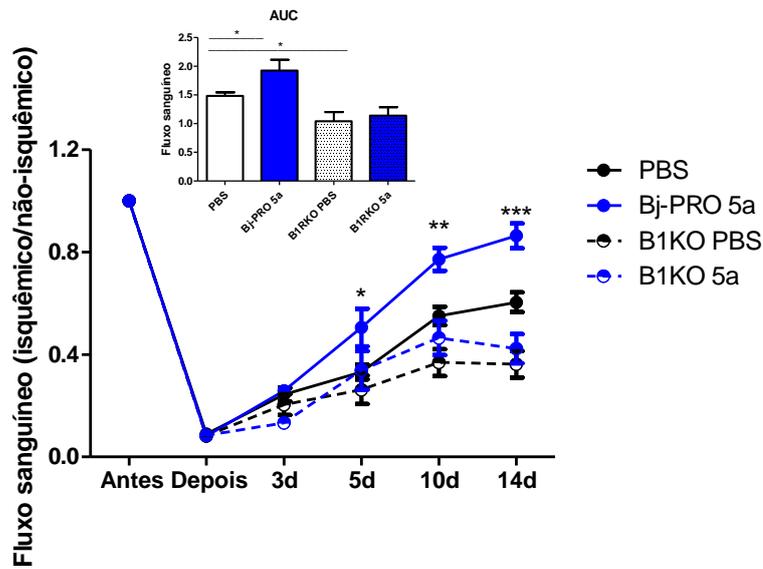


Figura 11: Efeitos do peptídeos *Bj-PRO-5a* sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos. Músculo adutor isquêmico coletado no 3º dia após OAF e utilizado o método de ELISA para dosagem dos níveis de VEGF. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=5/grupo, *p<0,05; comparado com veículo PBS.

5.6 O peptídeo *Bj*-PRO-5a não estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais deficientes na expressão gênica do receptor B1 de Bradicinina (B1RKO) submetidos à OAF

Com a intenção de avaliarmos o envolvimento do receptor B1R de bradicinina na estimulação da recuperação do fluxo sanguíneo de membros isquemiados induzida pelo peptídeo *Bj*-PRO-5a, foram utilizados animais nocautes para o receptor B1R (B1RKO). Os resultados encontrados mostraram que o efeito estimulatório induzido pelo peptídeo *Bj*-PRO-5a foi abolido em animais B1RKO nos dias 3 (B1RKO PBS 0.203800 ± 0.040370 ; B1RKO *Bj*-PRO-5a 0.132700 ± 0.019840), 5 (B1RKO PBS 0.262000 ± 0.055080 ; B1RKO *Bj*-PRO-5a 0.338200 ± 0.075560) 10 (B1RKO PBS 0.368200 ± 0.052800 ; B1RKO *Bj*-PRO-5a 0.464200 ± 0.066940) e 14 (B1RKO PBS 0.361600 ± 0.052340 ; B1RKO *Bj*-PRO-5a 0.422300 ± 0.057180) após a OAF (Figura 12).

A**B**

B1RKO – PBS

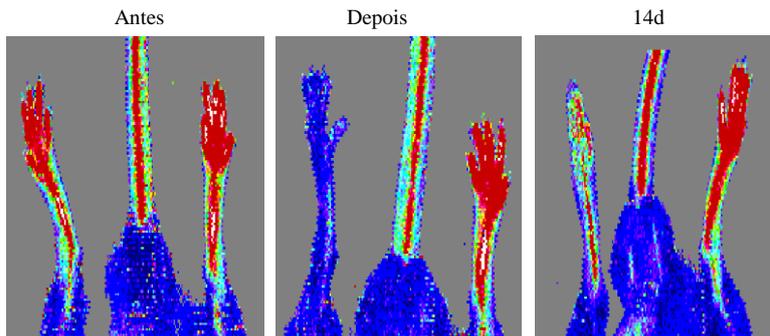
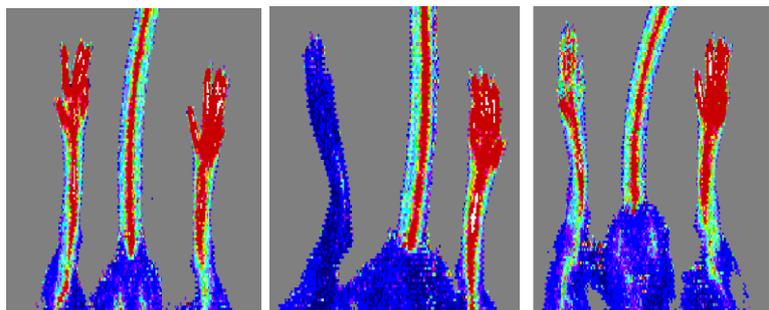
B1RKO - *Bj*-PRO-5a

Figura 12: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais B1RKO após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por imagem de perfusão por laser Doppler nos animais B1RKO controle (PBS) e nos tratados com *Bj*-PRO-5a. Área sobre a curva do fluxo sanguíneo. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente a OAF e no 14d após tratamento com *Bj*-PRO-5a. O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=7$ /grupo, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ para o grupo WT-*Bj*-PRO-5a comparado com WT-PBS veículo.

5.7 O peptídeo *Bj*-PRO-5a não estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B1RKO

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na angiogênese e arteriogênese foram feitas análises histomorfométricas dos cortes de músculos adutores isquemiados corados por H&E. Para isso, foi quantificado o número de capilares, de miócitos por mm² e de arteríolas em músculo adutor 14 dias após OAF. Observamos que não houve um aumento significativo na densidade capilar (B1RKO PBS 2105, $\pm 242,5$; B1RKO *Bj*-PRO-5a 2073, $\pm 327,5$), na densidade de miócitos (B1RKO PBS 2595, $\pm 319,4$; B1RKO *Bj*-PRO-5a 2175, $\pm 205,0$), na relação capilar/miócito (B1RKO PBS 0,8891, $\pm 0,01563$; B1RKO *Bj*-PRO-5a 0,9471, $\pm 0,06131$), e na densidade de arteríolas (B1RKO PBS 5,200, $\pm 0,5831$; B1RKO *Bj*-PRO-5a 3,000, $\pm 1,000$), nos animais B1RKO tratados com o *Bj*-PRO-5a em relação aos animais controle B1RKO (Figura 13). Perante isso, uma vez que os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a foram abolidos na ausência do receptor B1R, nossos dados sugerem que o receptor B1 de bradicinina (B1R) é uma possível via envolvida na ação pró-angiogênica do *Bj*-PRO-5a aqui estudado.

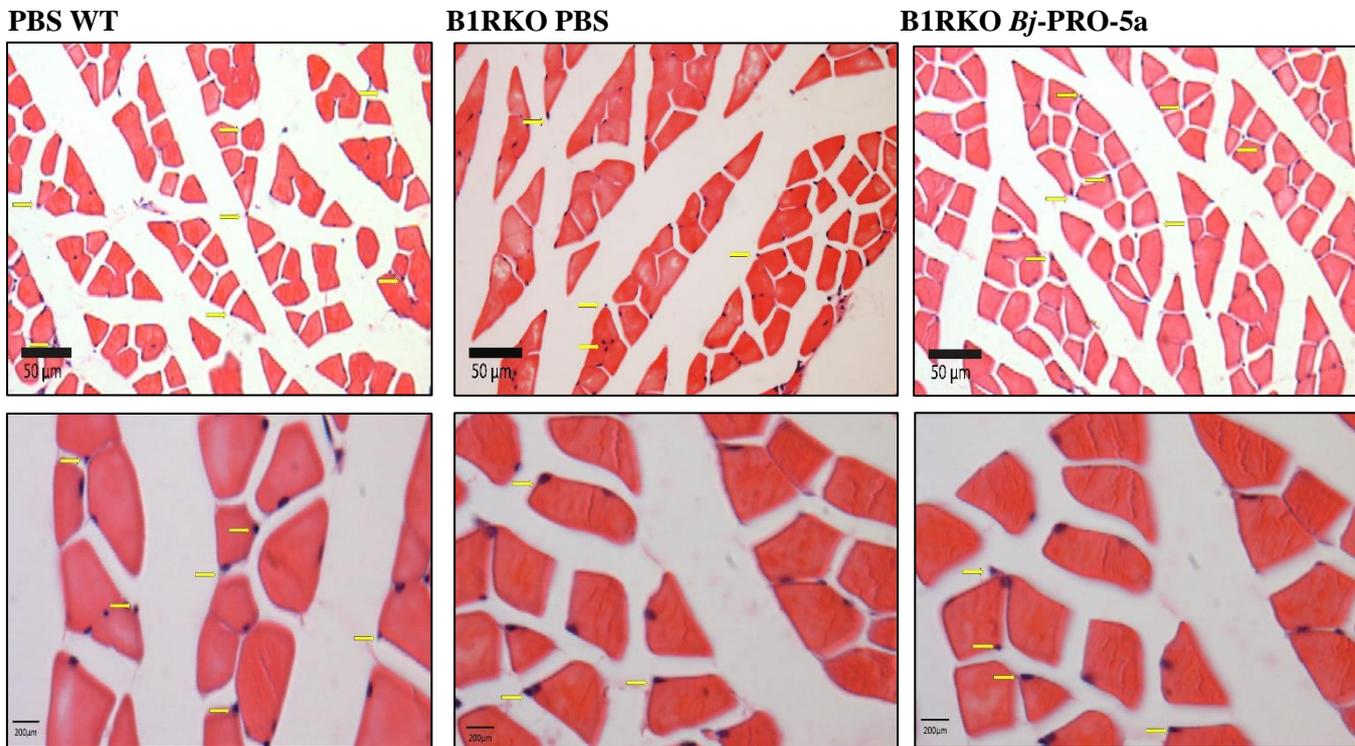
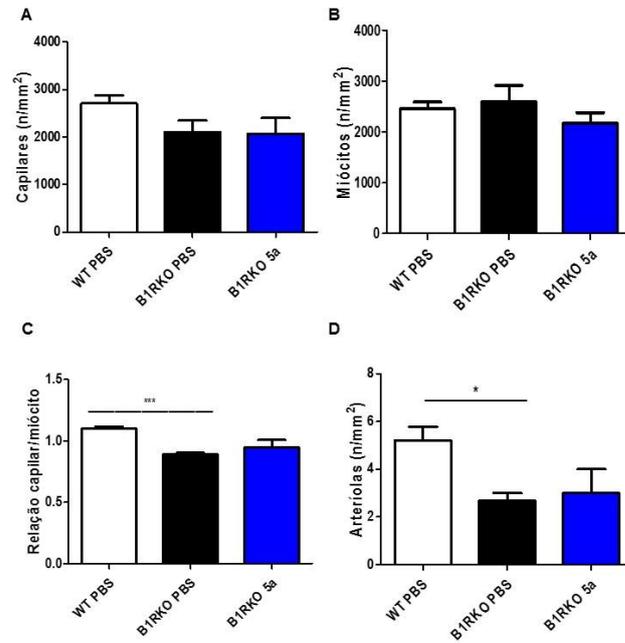


Figura 13: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B1RKO. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de (D) densidade de arteríolas no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Os dados representam a média ± e.p.m., n=4/grupo, *p<0,05 comparado com veículo PBS-WT. (E) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS veículo ou *Bj*-PRO-5a. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x, barra escala – 50 µm, 1000x - 200 µm)

5.8 O peptídeo *Bj*-PRO-5a não estimula a produção de VEGF em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B1RKO

Com intuito de investigar possíveis mecanismos de ação pelo qual o peptídeo *Bj*-PRO-5a induz a produção de VEGF após a OAF, avaliamos os efeitos do *Bj*-PRO-5a nos níveis de VEGF no músculo isquêmico de animais B1RKO, através da técnica de ELISA. Os resultados obtidos demonstraram que não houve um aumento significativo nos níveis de VEGF no músculo (PBS – 358,1, \pm 37,97; *Bj*-PRO-5a 522,9, \pm 51,27) de animais B1RKO tratados com *Bj*-PRO-5a em relação ao grupo de animais B1RKO tratados com veículo. Esses dados sugerem, uma vez que o *Bj*-PRO-5a estimula a produção de VEGF no músculos de animais WT, que o receptor B1R pode estar envolvido nos efeitos estimulatórios induzidos pelo peptídeo *Bj*-PRO-5a, sobre os níveis de VEGF no músculo isquemiado (Figura 14).

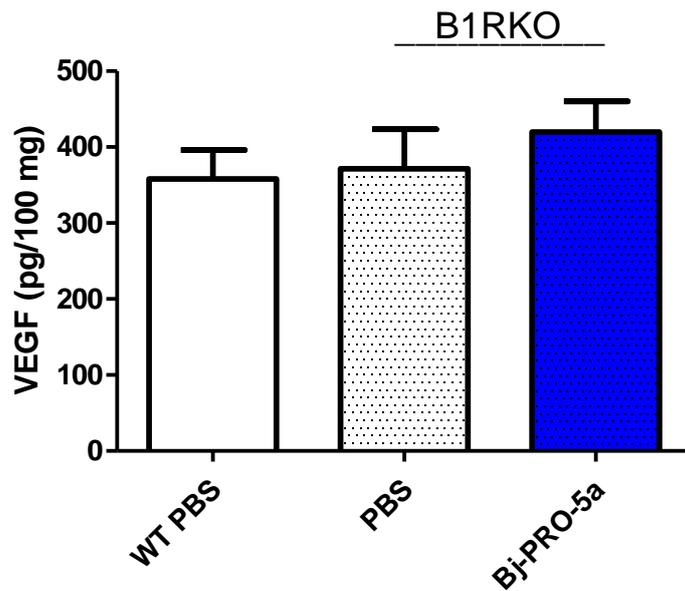


Figura 14: Efeitos do peptídeos *Bj-PRO-5a* sobre a produção de VEGF em animais B1RKO submetidos a OAF. Músculo adutor isquêmico coletado no 3º dia após OAF e utilizado o método de ELISA para dosagem dos níveis de VEGF. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=5/grupo. Não houve diferença entre os animais B1RKO tratados com *Bj-PRO-5a* comparado com os animais tratados com veículo PBS.

5.9 - Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas em animais B1RKO após a OAF

Para avaliar os efeitos do *Bj*-PRO-5a sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas (CTAs) após a OAF, avaliamos a frequência dessas células na medula óssea e no sangue no 3º dia pela técnica de citometria de fluxo. Nossos dados mostram que o *Bj*-PRO-5a não teve efeito sobre a frequência de células Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺ (PBS B1RKO $0,3641 \pm 0,01416$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,3700 \pm 0,04119$), LSK⁻VEGFR2⁺ (PBS B1RKO $0,1859 \pm 0,01726$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,1960 \pm 0,02118$), Lin⁻ckit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺ (PBS B1RKO $0,2172 \pm 0,02046$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,2086 \pm 0,02893$) na medula óssea de animais B1RKO.

De forma similar, quando avaliamos os efeitos do *Bj*-PRO-5a sobre a mobilização de células Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺ (PBS B1RKO $0,01648 \pm 0,001843$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,01421 \pm 0,001559$) LSK⁻VEGFR2⁺ (PBS B1RKO $0,008542 \pm 0,0006695$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,004439 \pm 0,001372$), Lin⁻ckit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺ (PBS B1RKO $0,01140 \pm 0,0008574$, *Bj*-PRO-5a B1RKO $0,01038 \pm 0,002224$) para o sangue, não observamos aumento na frequência dessas células no grupo tratado com *Bj*-PRO-5a quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

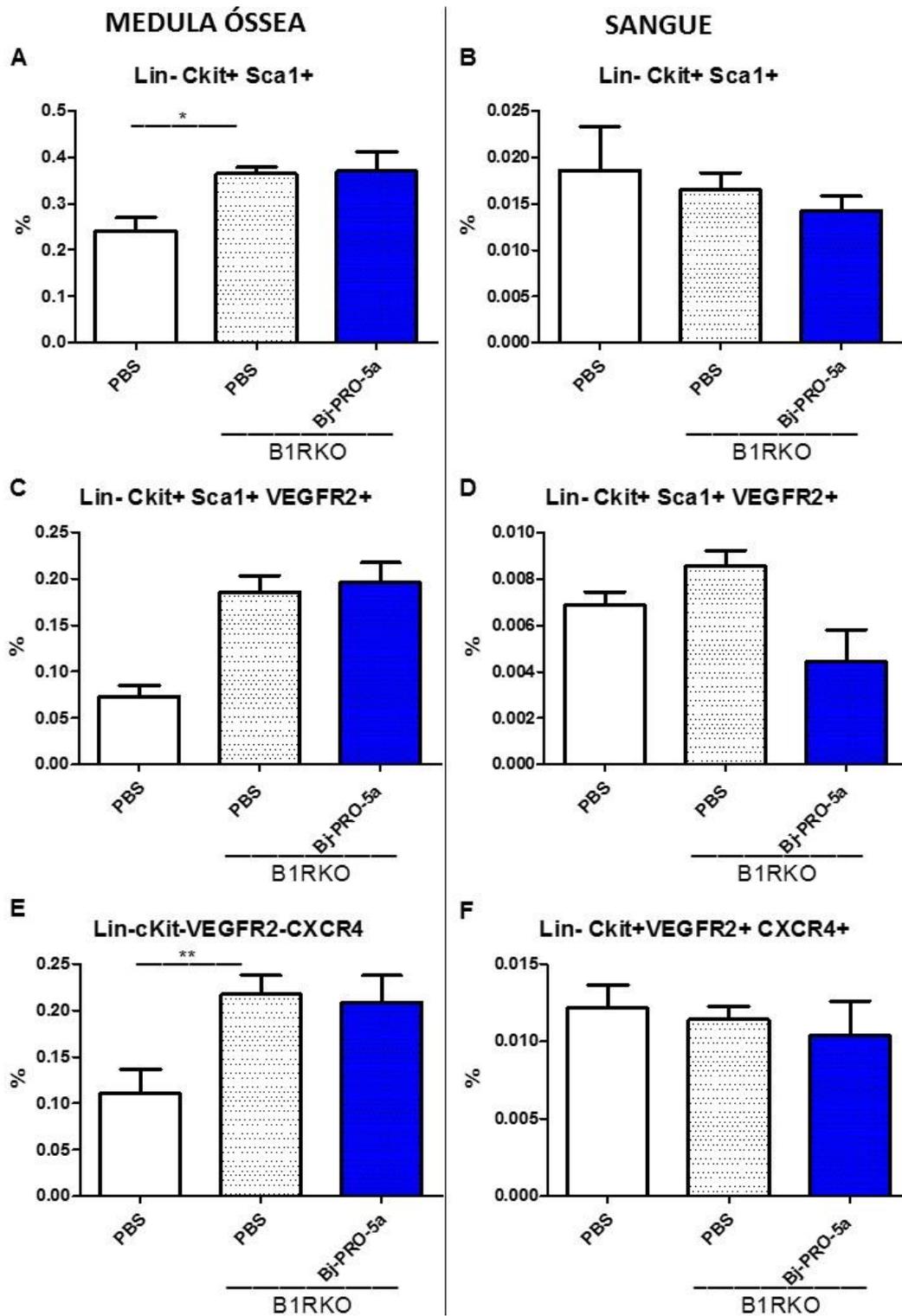
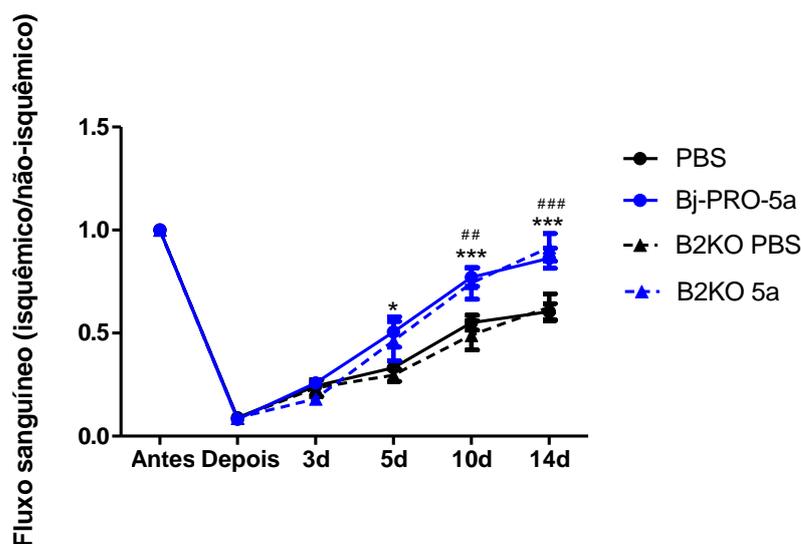


Figura 15: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais B1RKO após a OAF. Citometria de fluxo de células da medula óssea e do sangue periférico no 3º dia após OAF. (A-B) LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺), (C-D) LSK-VEGFR2⁺, (E-F) Lin⁻c-kit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺. Os valores estão representados como porcentagem de células encontradas \pm e.p.m., n=7/grupo, **p<0,01, *p<0,05 (Teste t de Student); de animais tratados com *Bj*-PRO-5a em relação aos animais controles tratados com veículo PBS.

5.10 O peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais deficientes na expressão gênica do receptor B2 de Bradicinina (B2RKO) submetidos à OAF.

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na recuperação do fluxo sanguíneo em membros isquemiados de animais B2RKO submetidos a OAF, utilizamos a técnica de imagem de perfusão por laser Doppler – LDPI. Observamos que houve uma melhora significativa na recuperação do fluxo sanguíneo no 10d (## $p < 0,05$ B2RKO PBS 0.55070, \pm 0.03591; B2RKO *Bj*-PRO-5a 0.77120, \pm 0.044930) e no 14d (### $p < 0,05$ B2RKO PBS 0.60380, \pm 0.03871; B2RKO *Bj*-PRO-5a 0.86320, \pm 0.048620) em ambos os animais WT e B2RKO tratados com o *Bj*-PRO-5a em relação aos animais controle tratados com veículo PBS (Figura 16).

A**B**

B2RKO - PBS

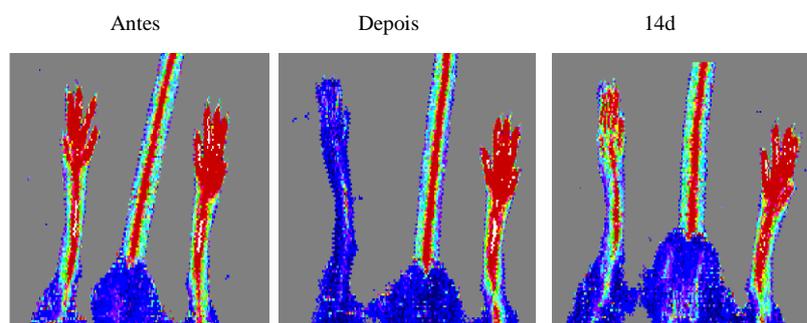
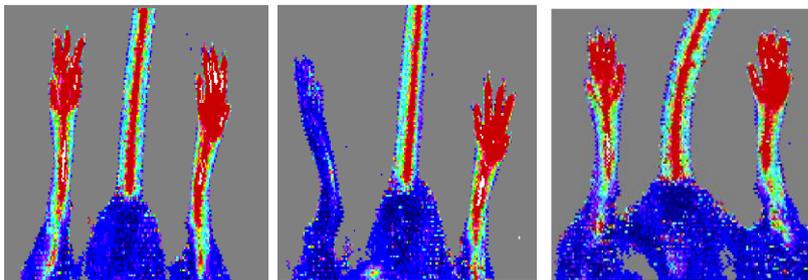
B2RKO - *Bj*-PRO-5a

Figura 16: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais B2RKO após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por imagem de perfusão por laser Doppler nos animais B2RKO controle (PBS) e nos animais tratados com *Bj*-PRO-5a. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente a OAF e no 14d após tratamento com *Bj*-PRO-5a. O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós- teste Bonferroni. Os dados representam a média, \pm e.p.m., $n=7$ /grupo, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ para o grupo WT-*Bj*-PRO-5a comparado com WT-PBS veículo e # para o grupo B2RKO PBS comparado com B2RKO *Bj*-PRO-5a.

5.11 O peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B2RKO.

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na angiogênese e arteriogênese foram feitas análises histomorfométricas dos cortes de músculos adutores isquemiados corados por H&E. Foi quantificado o número de capilares, de miócitos por mm² e de arteríolas em músculo adutor isquemiado 14 dias após OAF. Observamos que houve um aumento significativo na densidade capilar (*p<0,05 B2RKO PBS 1927, ±160,2; B2RKO *Bj*-PRO-5a 2477, ±61,73), na relação capilar/miócito (*p<0,05 B2RKO PBS 0,9486, ±0,05100; B2RKO *Bj*-PRO-5a 1,105, ±0,03186), e na densidade de arteríolas (*p<0,05 B2RKO PBS 4,000, ±0,5774; B2RKO *Bj*-PRO-5a 8,250, ±0,4787), mas não na densidade de miócitos (B2RKO PBS 2119, ±113,6; B2RKO *Bj*-PRO-5a 2324, ±58,57) nos animais B2RKO tratados com o *Bj*-PRO-5a em relação aos animais controle B2RKO que recebiam PBS (Figura 17). Esses dados evidenciam que o receptor B2R não parece estar envolvido nos efeitos estimulatórios do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a revascularização no modelo murino de OAF.

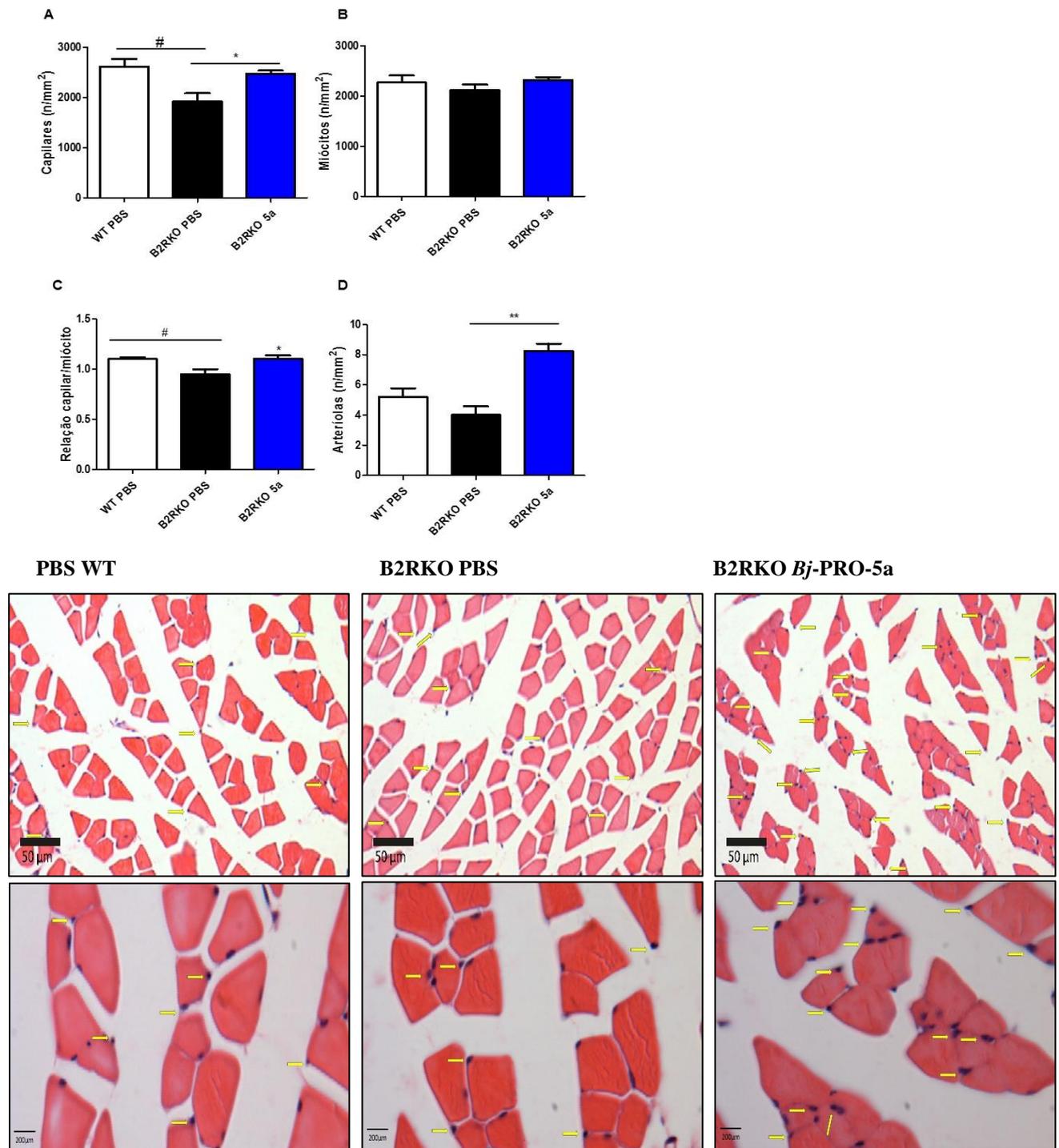
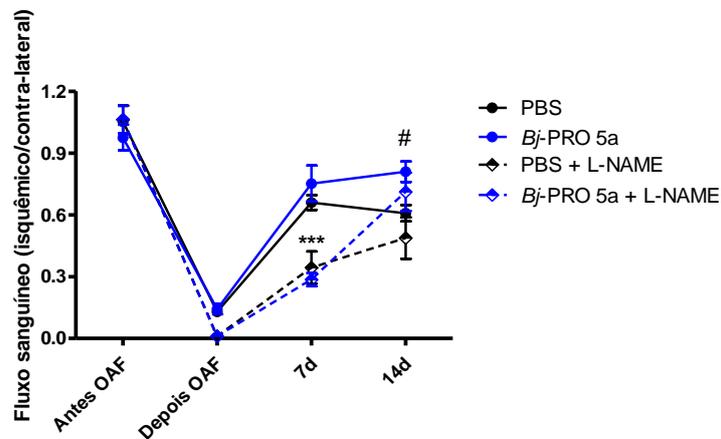


Figura 17: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais B2RKO. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de (D) densidade de arteríolas no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Observa-se que houve um aumento significativo entre o grupo tratado B2RKO *Bj*-PRO-5a comparado com veículo PBS B2RKO. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=4$ /grupo, $*p<0,05$ comparado com veículo PBS-B2RKO e # comparado com WT PBS. (E) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com *Bj*-PRO-5a e corados por H&E. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x, barra escala – 50 μ m, 1000x - 200 μ m).

5.12 O peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais tratados com L-NAME submetidos à OAF

O papel do óxido nítrico (NO) na angiogênese é importante e bem descrito, sendo ele considerado uma potente molécula pró-angiogênica que pode atuar em diversos processos que estimulam a neovascularização (PRIOR *et al.*, AMANO *et al.*, 2003; MUROHARA *et al.*, 1998).

Com intuito de avaliar o papel de NO como possível via de ação dos *Bj*-PRO-5a para indução de seus efeitos pró-angiogênicos, animais WT foram tratados com NG nitro- L-arginina metil éster (L-NAME) (inibidor da NOS – óxido nítrico sintase) na dose de 20mg/kg por via intraperitoneal, concomitante com os *Bj*-PRO-5a. Avaliamos os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a na recuperação do fluxo sanguíneo em membros isquemiados de animais tratados com L-NAME submetidos a OAF, utilizamos a técnica de imagem de perfusão por laser Doppler – LDPI. Observamos que houve uma melhora na recuperação do fluxo sanguíneo no 14d (# $p < 0,05$ PBS+L-NAME 0.55070, \pm 0.03591; *Bj*-PRO-5a+L-NAME 0.77120, \pm 0.044930) nos animais tratados com o *Bj*-PRO-5a+ L-NAME em relação aos animais controle tratados com veículo PBS+L-NAME (Figura 18).

A**B**

PBS + L-NAME

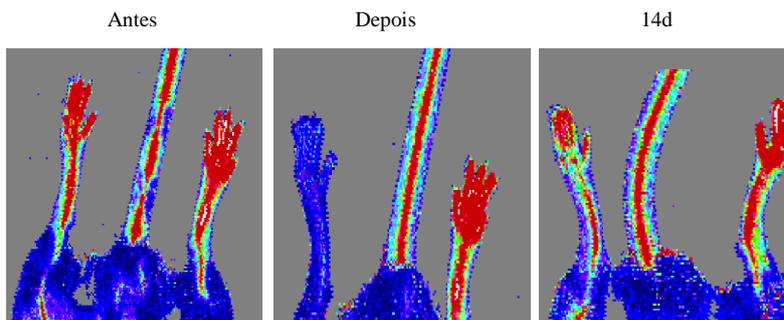
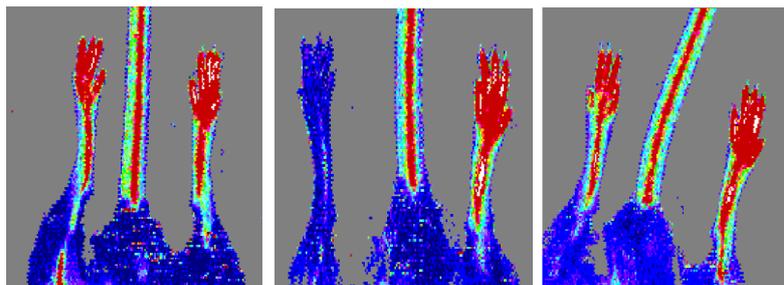
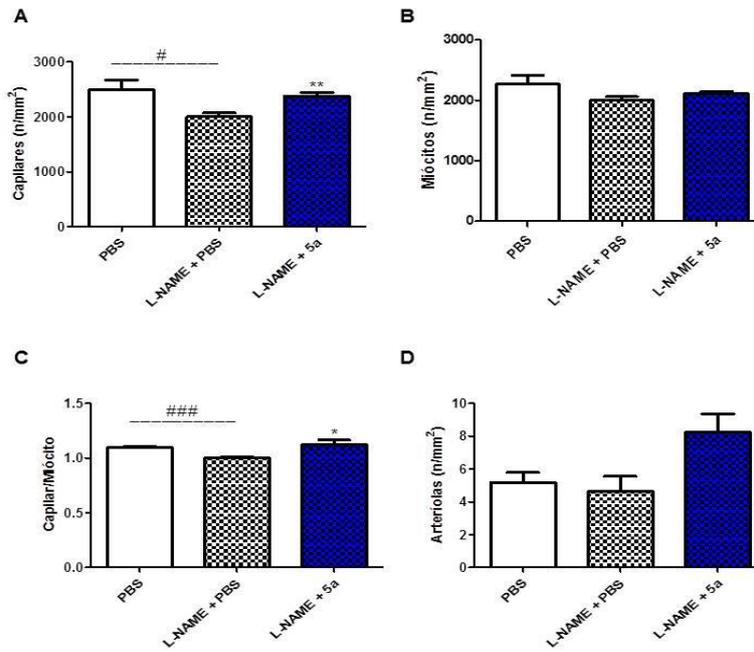
*Bj*-PRO-5a + L-NAME

Figura 18: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais tratados com L-NAME após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por imagem de perfusão por laser Doppler nos animais tratados com L-NAME controle (PBS) e nos animais tratados com L-NAME + *Bj*-PRO-5a. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente a OAF e no 14d após tratamento com *Bj*-PRO-5a. O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós- teste Bonferroni. Os dados representam a média, \pm e.p.m., $n=7$ /grupo, $***p<0,001$, para o grupo WT-*Bj*-PRO-5a comparado com WT-PBS veículo e # para o grupo PBS + L-NAME comparado com *Bj*-PRO-5a + L-NAME.

5.13 O peptídeo *Bj-PRO-5a* estimula a angiogênese e arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais tratados com L-NAME

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* na angiogênese e arteriogênese de animais tratados com L-NAME, foram feitas análises histomorfométricas dos cortes de músculos adutores isquemiados corados por H&E. Foi quantificado o número de capilares, de miócitos por mm² e de arteríolas em músculo adutor isquemiado 14 dias após OAF. Nossos dados mostram que a co-administração com L-NAME concomitantemente com *Bj-PRO-5a*, não aboliu os efeitos estimulatórios do *Bj-PRO-5a* sobre a densidade capilar (* $p < 0,05$ PBS+L-NAME 2001, $\pm 72,93$; *Bj-PRO-5a*+L-NAME 2378, $\pm 68,11$) e a relação capilar/miócito (* $p < 0,05$ PBS+L-NAME média 1,001, e.p.m. 0,008048; *Bj-PRO-5a*+L-NAME média 1,126, e.p.m. 0,03718). Não houve diferença entre a densidade de miócitos (PBS+L-NAME 1998, $\pm 61,69$; *Bj-PRO-5a*+L-NAME 2113, $\pm 31,19$). Em relação ao número de arteríolas, o tratamento com L-NAME aparentemente aboliu os efeitos pró-arteriogênicos nos músculos de membros posteriores isquêmicos (PBS+L-NAME 4,667, $\pm 0,8819$; *Bj-PRO-5a*+L-NAME 8,250, $\pm 1,109$). Esses dados sugerem que o óxido nítrico (NO), inibido pela administração de L-NAME, não parece estar diretamente envolvido nos efeitos estimulatórios do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a revascularização no modelo murino de OAF (Figura 19).



PBS WT

L-NAME + PBS

L-NAME + *Bj*-PRO-5a

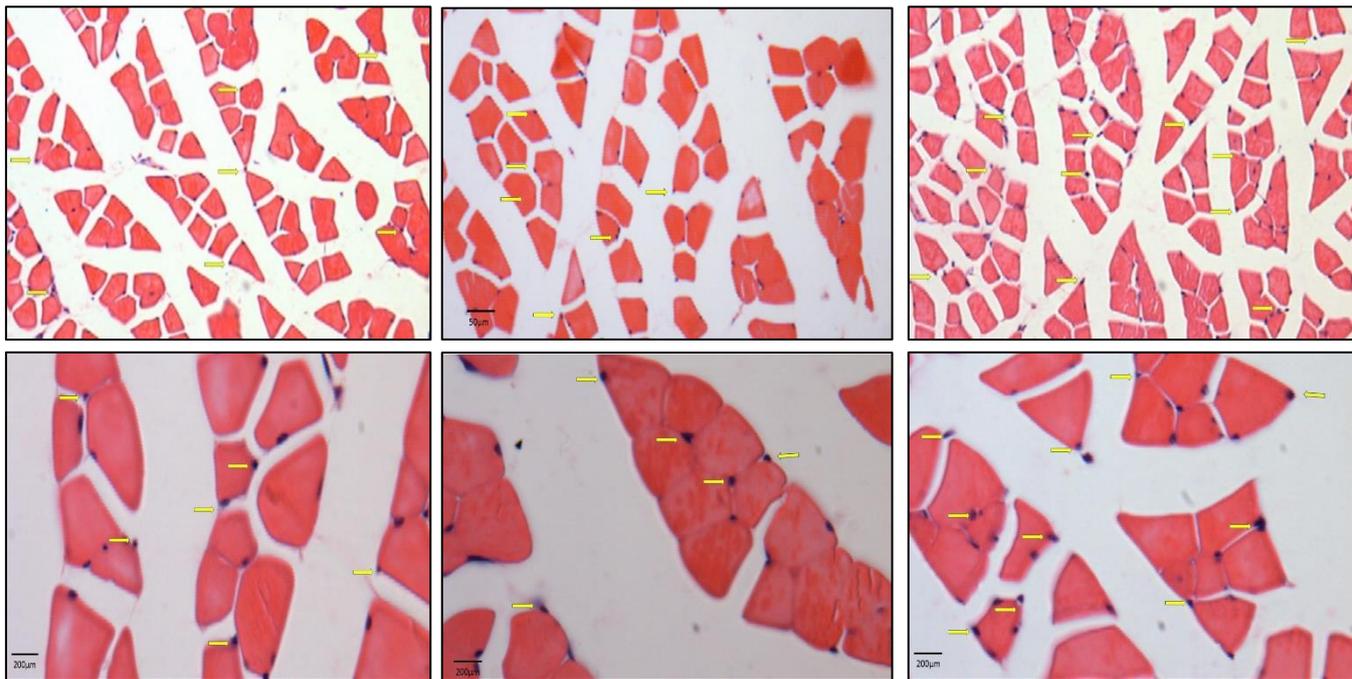
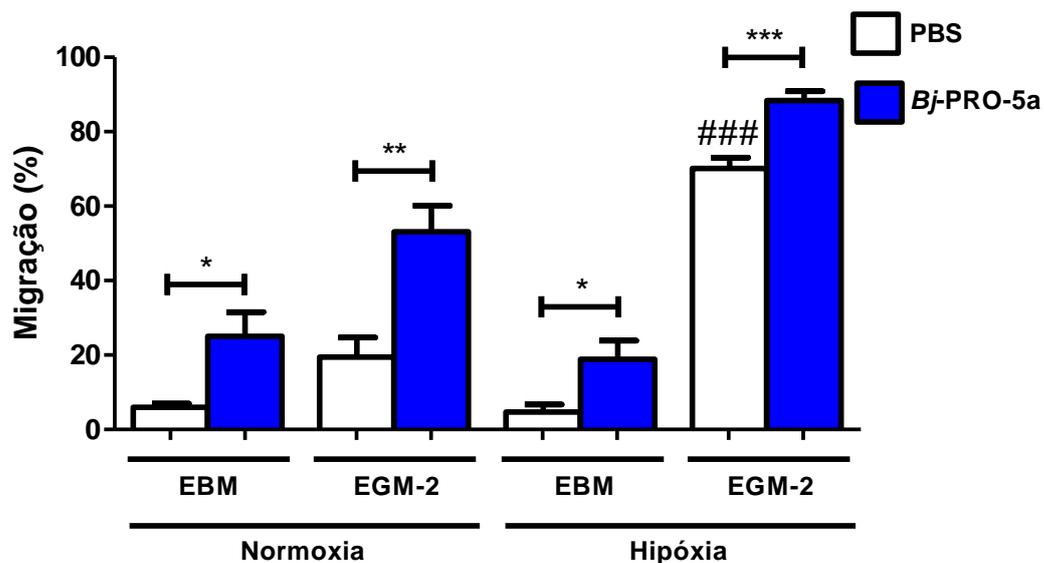
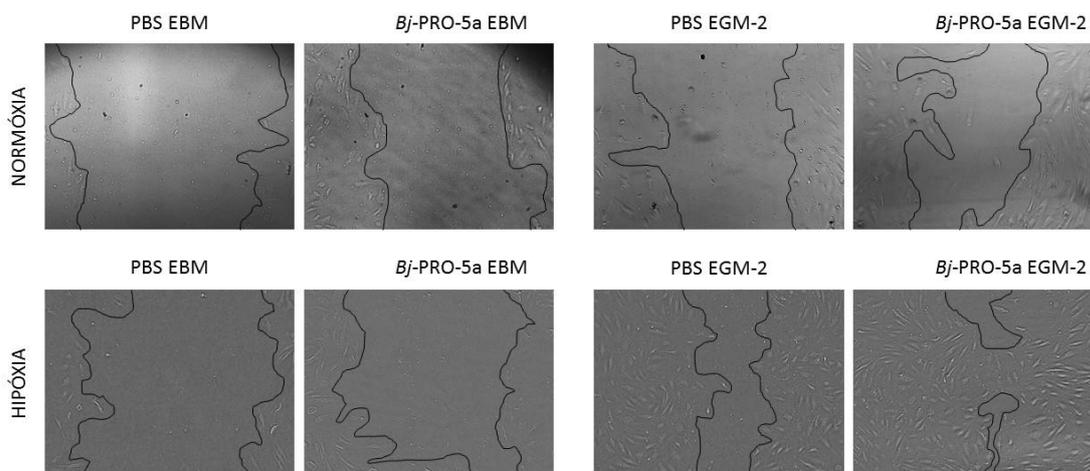


Figura 19: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a densidade de capilares, miócitos e arteríolas em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais tratados com L-NAME. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de (D) densidade de arteríolas no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Observa-se que houve um aumento significativo entre o grupo *Bj*-PRO-5a + L-NAME comparado com veículo PBS + L-NAME. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=5$ /grupo, $**p<0,01$, $*p<0,05$ comparado com veículo PBS e # comparado com PBS + L-NAME. (E) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com *Bj*-PRO-5a e corados por H&E. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x, barra escala – 50 μ m, 1000x - 200 μ m).

5.14 O peptídeo *Bj-PRO-5a* estimula a migração e a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em condições de normóxia e hipóxia

Para avaliar se o *Bj-PRO-5a* tem efeito sobre a migração e a proliferação de células endoteliais, etapas do processo angiogênico, foi realizado um ensaio de scratch e incorporação com BrdU, respectivamente, com HUVECs na presença ou ausência do peptídeo *Bj-PRO-5a* (100nM). Nossos dados mostram que 36h após ao tratamento com *Bj-PRO-5a*, a capacidade de migração foi significamente maior nas células tratadas com *Bj-PRO-5a* em meio EBM (* $p < 0,05$ normoxia PBS 5,961, $\pm 0,9701$, *Bj-PRO-5a* 25,06, $\pm 6,511$; hipóxia PBS 4,748, $\pm 1,929$; *Bj-PRO-5a* 18,91, $\pm 4,977$), quanto em meio EGM-2 (** $p < 0,01$ normoxia PBS 19,45, $\pm 5,224$, *Bj-PRO-5a* 53,10, $\pm 6,997$; hipóxia PBS 70,10, $\pm 2,93$, *Bj-PRO-5a* 88,37, $\pm 2,486$), quando comparada às células tratadas apenas com veículo PBS, em condições de normoxia (5% CO₂) e hipóxia (1,01 Vol-% de oxigênio para 5,01 Vol-% de gás carbônico) (Figura 20).

Além disso, quando quantificamos o efeito de *Bj-PRO-5a* sobre a proliferação de HUVECs 24h após o tratamento com o peptídeo, verificamos que em condições de normoxia, mas não de hipóxia, houve um aumento na capacidade de proliferação das células tratadas com *Bj-PRO-5a* (** $p < 0,01$ PBS, 0,9785, $\pm 0,04145$, *Bj-PRO-5a* 1,435, $\pm 0,09251$) quando comparadas as células tratadas com veículo PBS (Figura 21). Perante isso, nossos dados sugerem que *Bj-PRO-5a* tem efeito por si só, na migração de células endoteliais, em condições de normoxia e hipóxia, independente da presença ou ausência de estímulos e fatores de crescimento (EGM-2, hipóxia). Entretanto, os efeitos estimulatórios de *Bj-PRO-5a* na proliferação de células endoteliais foi observado apenas em condição de normoxia-EBM, ou seja, um efeito direto sem a necessidade da presença de estímulos ou fatores de crescimento.

A**B****Figura 20: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a migração de células endoteliais**

(HUVECs) em condições de normoxia e hipoxia. (A) Migração de células HUVECs após o tratamento com *Bj-PRO-5a* 100nM em condições de normoxia e hipoxia. (B) Imagens representativas de ensaio de migração pela técnica de scratch após 36h, a quantificação da área aberta usando o software Tscratch. Os dados representam a média \pm e.p.m, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ em comparação com o controle PBS e # comparado com PBS EGM-2.

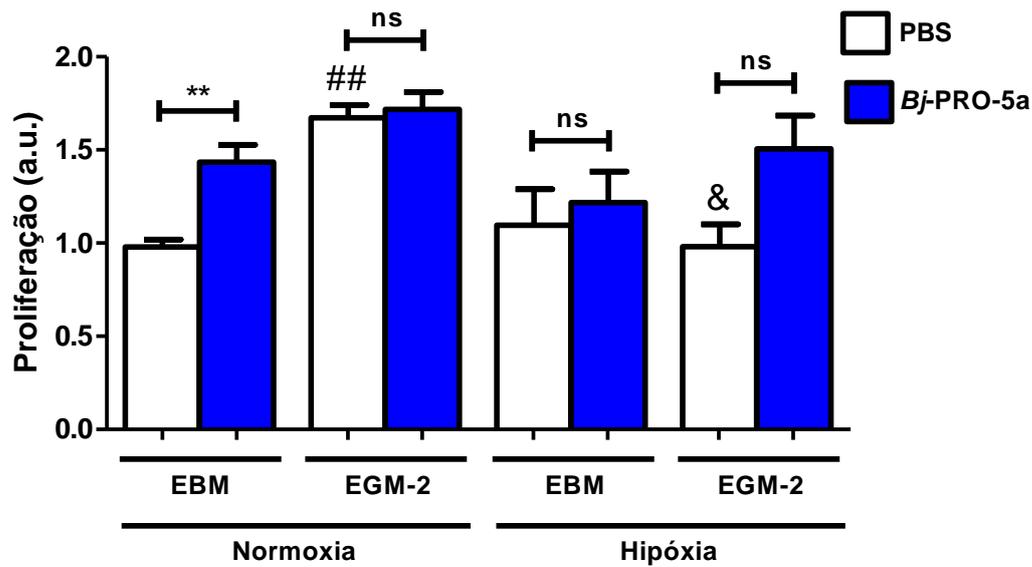


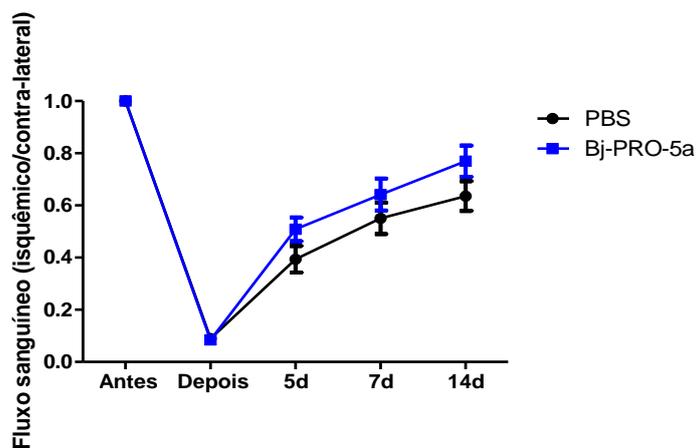
Figura 21: Efeitos do peptídeo Bj-PRO-5a sobre a proliferação de células endoteliais (HUVECs) em condições de normóxia e hipóxia. Proliferação de HUVECs após tratamento com Bj-PRO-5a 100 nM durante 24h avaliado por ensaio de incorporação de BrdU. As células foram testadas na presença de meio basal (EBM) com 0,1% de SFB, glicose e íons ou em meio suplementado (EGM-2) com 10% SFB, fatores de crescimento e citocinas, sob condições de normoxia ou hipoxia. Os dados representam a média \pm e.p.m, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ em comparação com o controle PBS e # comparado com PBS EGM-2.

5.15 O peptídeo *Bj*-PRO-5a não estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais hiperglicêmicos, no modelo de Diabetes Mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ)

Para avaliarmos se o *Bj*-PRO-5a têm efeitos na estimulação da recuperação do fluxo sanguíneo de membros isquemiados de animais diabéticos submetidos a OAF, utilizamos a técnica de imagem de perfusão por laser Doppler – LDPI . Os nossos resultados encontrados mostraram que o peptídeo *Bj*-PRO-5a não estimula a recuperação do fluxo sanguíneo em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina nos dias 5d (PBS 0.39380, \pm 0.05054; *Bj*-PRO-5a 0.50850, \pm 0.04545), 7d (PBS 0.55000, \pm 0.06000; *Bj*-PRO-5a 0.64160, \pm 0.06139) e 14d após a OAF (PBS 0.63580, \pm 0.05671; *Bj*-PRO-5a 0.77000, \pm 0.06000) (Figura 22-A).

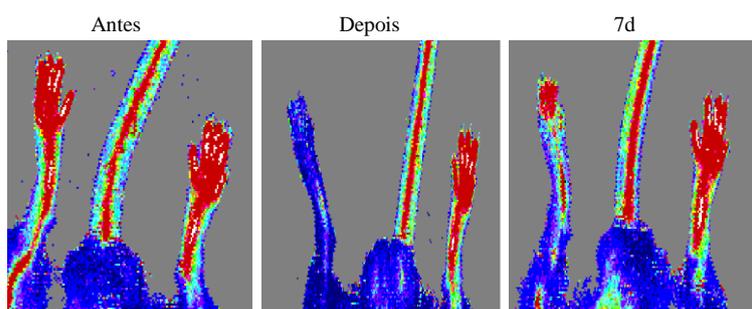
A figura 22-B contém imagens representativas da perfusão dos membros posteriores antes, imediatamente após e 7d após a OAF. Perante ao fato de não observamos efeito do *Bj*-PRO-5a sobre a revascularização pós-isquêmica em animais hiperglicêmicos induzidos por STZ, não foi realizada nenhuma outra avaliação utilizando material biológico desse grupo de animais.

A



B

PBS



Bj-PRO-5a

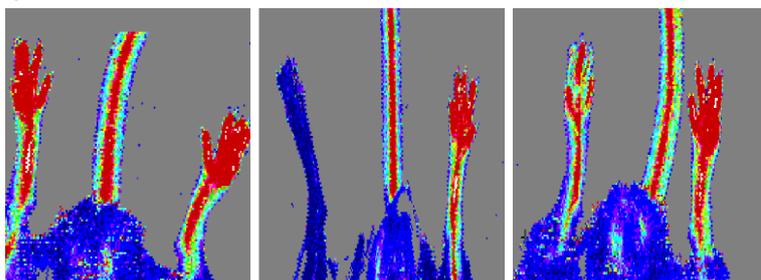
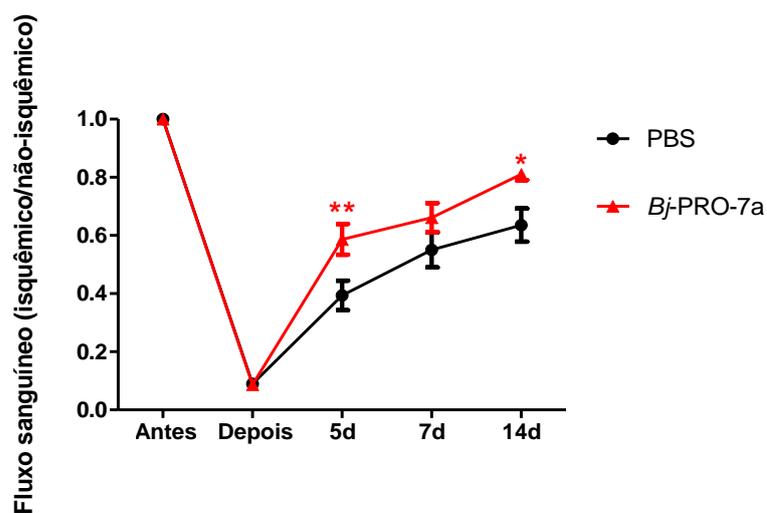


Figura 22: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-5a* sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos induzidos por STZ após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por LDPI nos animais diabéticos controle (PBS) e nos animais diabéticos tratados com *Bj-PRO-5a*. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente a OAF e no 7d após tratamento com *Bj-PRO-5a*. O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=7$ /grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com *Bj-PRO-5a* quando comparado ao grupo tratado com veículo PBS.

5.16 O peptídeo *Bj*-PRO-7a estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais diabéticos submetidos à OAF

Para avaliarmos os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-7a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores em animais diabéticos submetidos a OAF, utilizamos a técnica LDPI. Observamos que o fluxo foi aumentado no grupo tratado com *Bj*-PRO-7a nos dias 5 (** $p < 0,01$ PBS $0.39380, \pm 0.05054$; *Bj*-PRO-7a $0.58660, \pm 0.052780$) e 14 (* $p < 0,05$ PBS $0.63580, \pm 0.05671$; *Bj*-PRO-7a $0.81000, \pm 0.020000$) após a OAF, em relação ao grupo controle tratado com veículo PBS (Figura 23).

A**B**

PBS

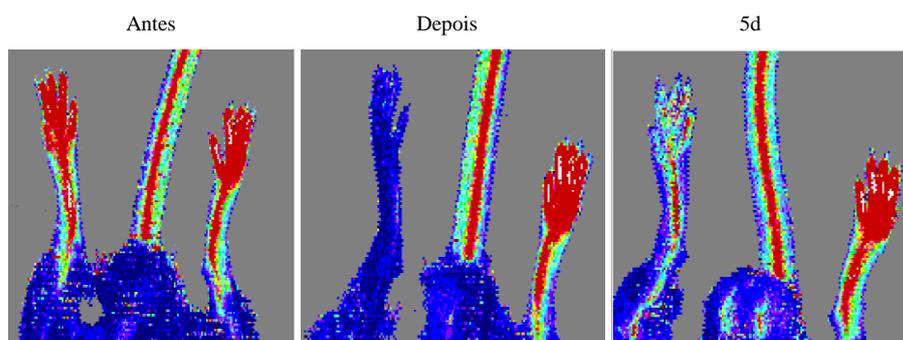
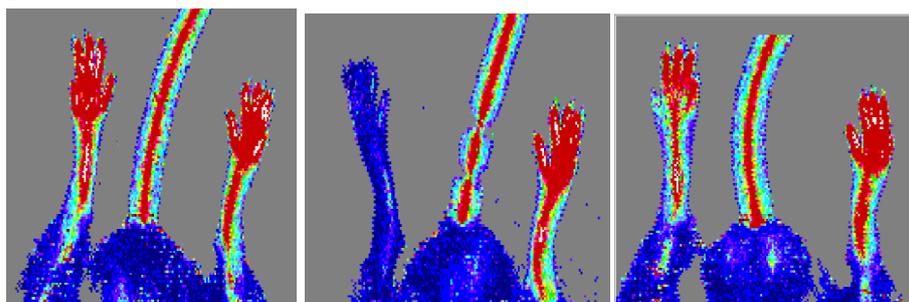
*Bj-PRO-7a*

Figura 23: Efeito do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por imagem de perfusão por LDPI nos animais controle (PBS) e nos animais tratados com *Bj-PRO-7a*. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente após a OAF e no 5d após a OAF e tratamento diário com *Bj-PRO-7a* (71nmol/kg). O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=8$ /grupo, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ comparado com PBS veículo.

5.17 O peptídeo *Bj-PRO-7a* estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* na angiogênese, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj-PRO-7a*, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e processados para análises histomorfométricas de cortes corados por H&E. Para isso, foi quantificado o número de capilares e de miócitos por mm². Observamos que houve um aumento significativo na densidade de capilares (* $p < 0,05$ PBS 2845, \pm 146,2; *Bj-PRO-7a* 3558, \pm 195,2), na relação capilar/miócito (** $p < 0,01$ PBS 1,083, \pm 0,03145; *Bj-PRO-7a* 1,210, \pm 0,01139), mas não na densidade de miócitos (PBS 2465, \pm 126,1; *Bj-PRO-7a* 2841, \pm 152,3) nos animais tratados com o *Bj-PRO-7a* em relação aos animais que receberam PBS veículo (Figura 24).

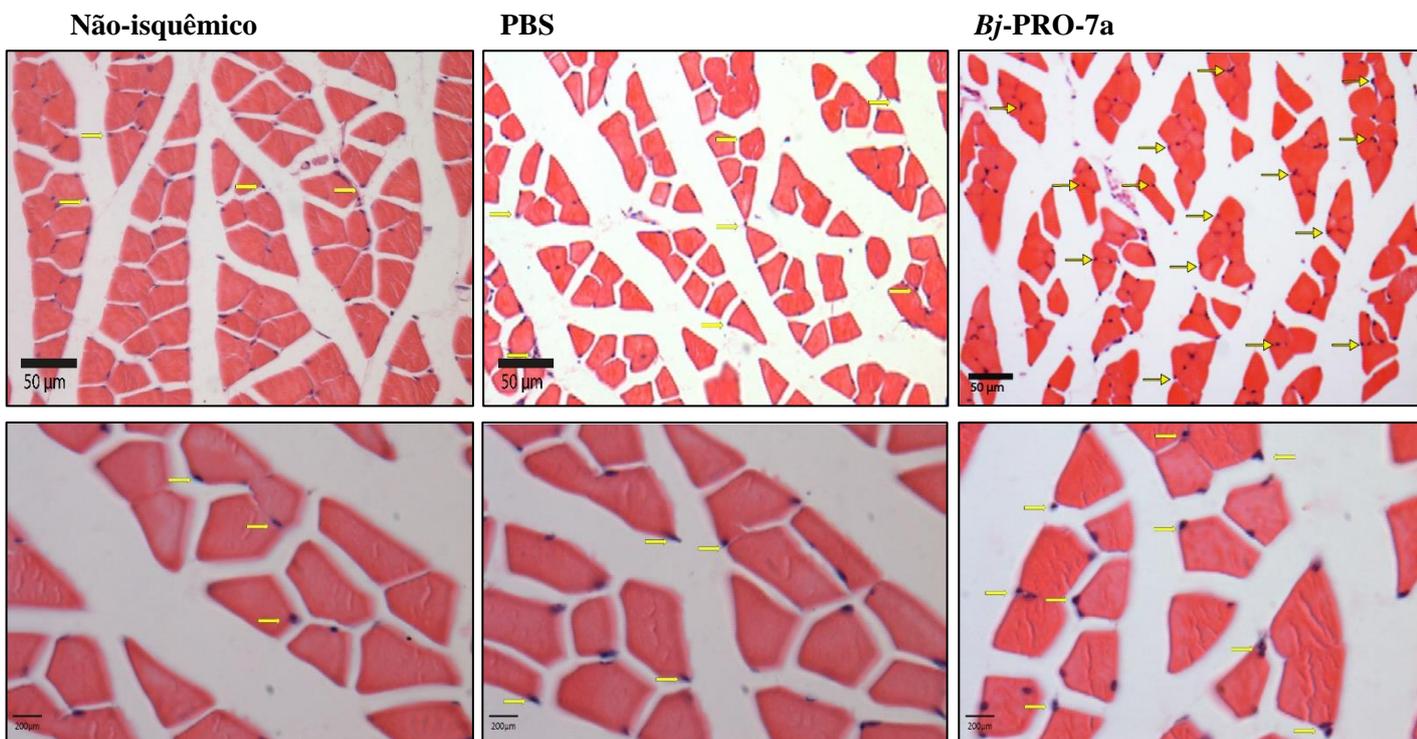
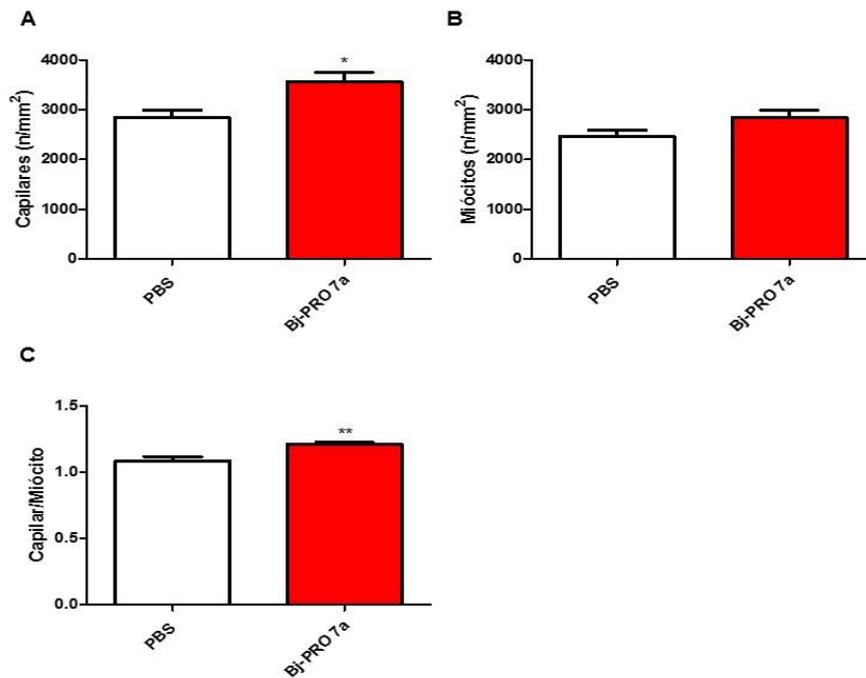


Figura 24: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de miócitos no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=6$ /grupo, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ comparado com veículo PBS. (D) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS veículo ou *Bj-PRO-7a*. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x, barra escala – 50 μ m, 1000x - 200 μ m).

5.18 Efeito do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* na arteriogênese *de novo*, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj-PRO-7a*, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e quantificado o número de arteríolas por mm². Observamos que não houve diferença significativa na densidade de arteríolas dos músculos isquemiados de animais tratados com *Bj-PRO-7a* (PBS 7,125, ± 0,6105; *Bj-PRO-7a* 9,286, ± 0,9184) em relação ao controle PBS (Figura 25).

Além disso, ao avaliarmos o remodelamento nas arteríolas dos músculos adutores dos membros isquemiados, observamos que houve um aumento significativo na área de luz (**p*<0,05 PBS 65,91, ± 9,114; *Bj-PRO-7a* 181,3, ± 41,59), área de parede vascular (***p*<0,01 PBS 138,8, ± 14,73; *Bj-PRO-7a* 249,7, ± 27,52) e na área vascular total (***p*<0,01 PBS 216,9, ± 17,34; *Bj-PRO-7a* 431,1, ± 68,26) do grupo tratado com *Bj-PRO-7a* em comparação com o grupo controle PBS 14° dia após a OAF (Figura 25). A tabela 3 representa a razão de remodelamento e relação parede/luz, respectivamente, entre os grupos estudados.

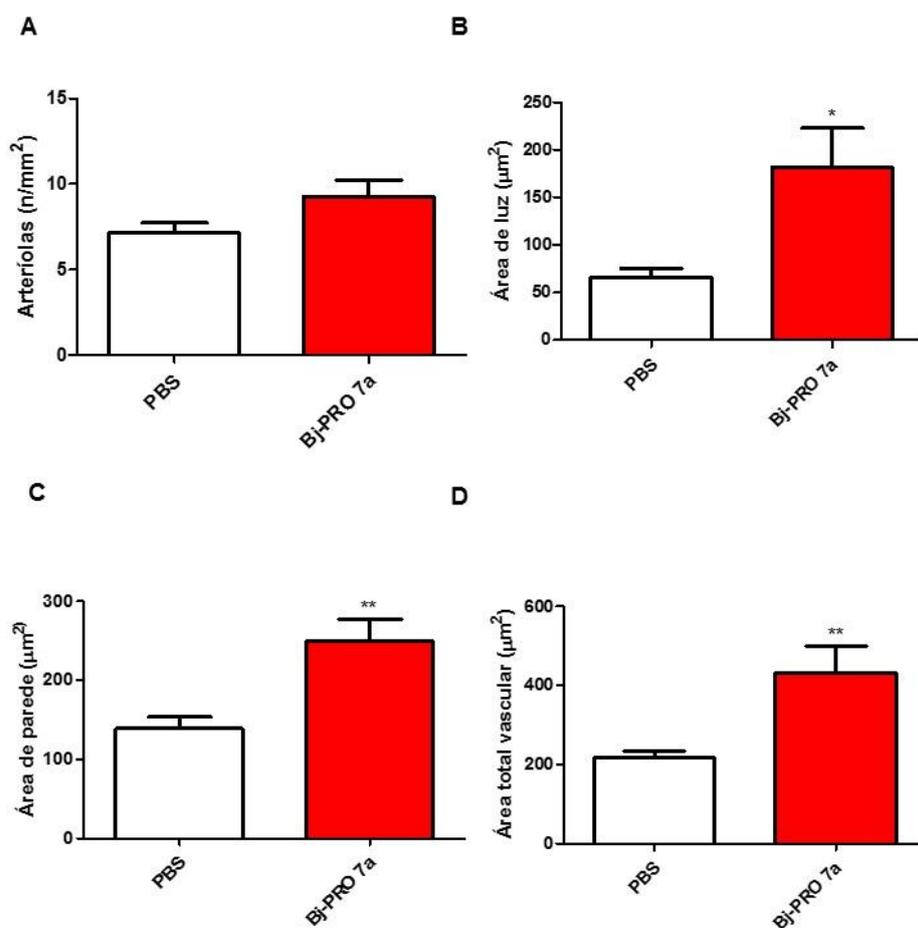


Tabela 3:

GRUPO	Razão de remodelamento	Relação parede/luz
SHAM	--	1,930
PBS	1,35	2,363
<i>Bj-PRO-7a</i>	2,78	1,524

Dados expressos em média

Figura 25: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre a arteriogênese *de novo* e remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos. (A) Densidade de arteríolas, (B) área da luz vascular, (C) área de parede vascular e (D) área total vascular no músculo adutor isquemiado no 14^o dia após a OAF. Tabela 3 expressa a razão de remodelamento e a relação parede/luz. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=5/grupo, **p<0,01, *p<0,05 comparado com veículo PBS.

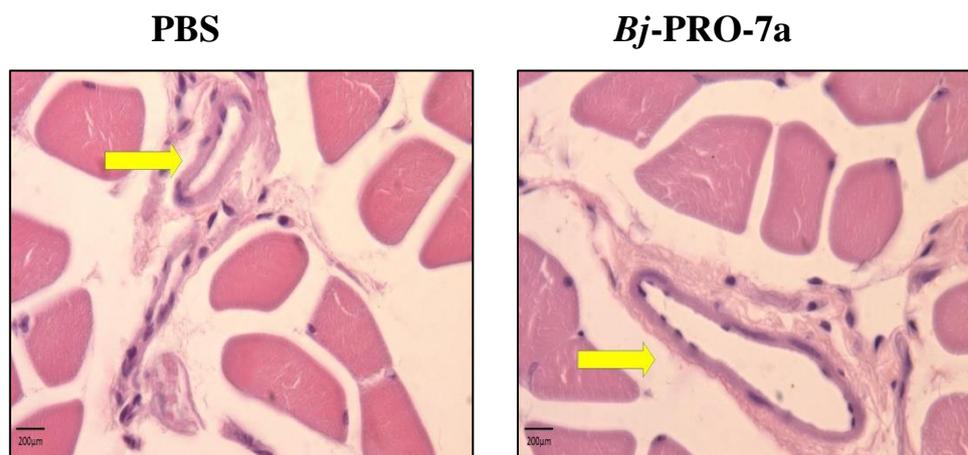


Figura 26: Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais diabéticos tratados com *Bj-PRO-7a*. As setas indicam arteríolas entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 1000x, barra escala – 200 µm).

5.19 Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* na frequência de células-tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e no sangue de animais diabéticos no 3º dia após a OAF, usamos a técnica de citometria de fluxo. Nossos resultados mostram que o *Bj-PRO-7a* aumentou a frequência de células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{ckit}^+$) na medula óssea (* $p < 0,05$ PBS 0,2373, $\pm 0,02456$; *Bj-PRO-7a* 0,3717, $\pm 0,06131$), mas não no sangue (PBS 0,006354, $\pm 0,001172$; *Bj-PRO-7a* 0,006570, $\pm 0,001436$) de animais diabéticos. Em relação a subpopulação LSK VEGFR2⁺, o peptídeo *Bj-PRO-7a* aumentou a frequência dessas células na medula óssea (* $p < 0,05$ PBS 0,06070, $\pm 0,004074$; *Bj-PRO-7a* 0,08232, $\pm 0,01035$), como também teve efeito na mobilização dessas células para o sangue (* $p < 0,05$ PBS 0,002724, $\pm 0,0003667$; *Bj-PRO-7a* 0,005633, $\pm 0,001317$). Além disso, o peptídeo *Bj-PRO-7a* aumentou a frequência de células com fenótipo $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{VEGFR2}^+ \text{CXCR4}$ na medula óssea (* $p < 0,05$ PBS 0,05669, $\pm 0,003435$; *Bj-PRO-7a* 0,1001, $\pm 0,02209$) e a mobilização para o sangue (** $p < 0,01$ PBS 0,001421, $\pm 0,0002246$; *Bj-PRO-7a* 0,003657, $\pm 0,0005952$) (Figura 28).

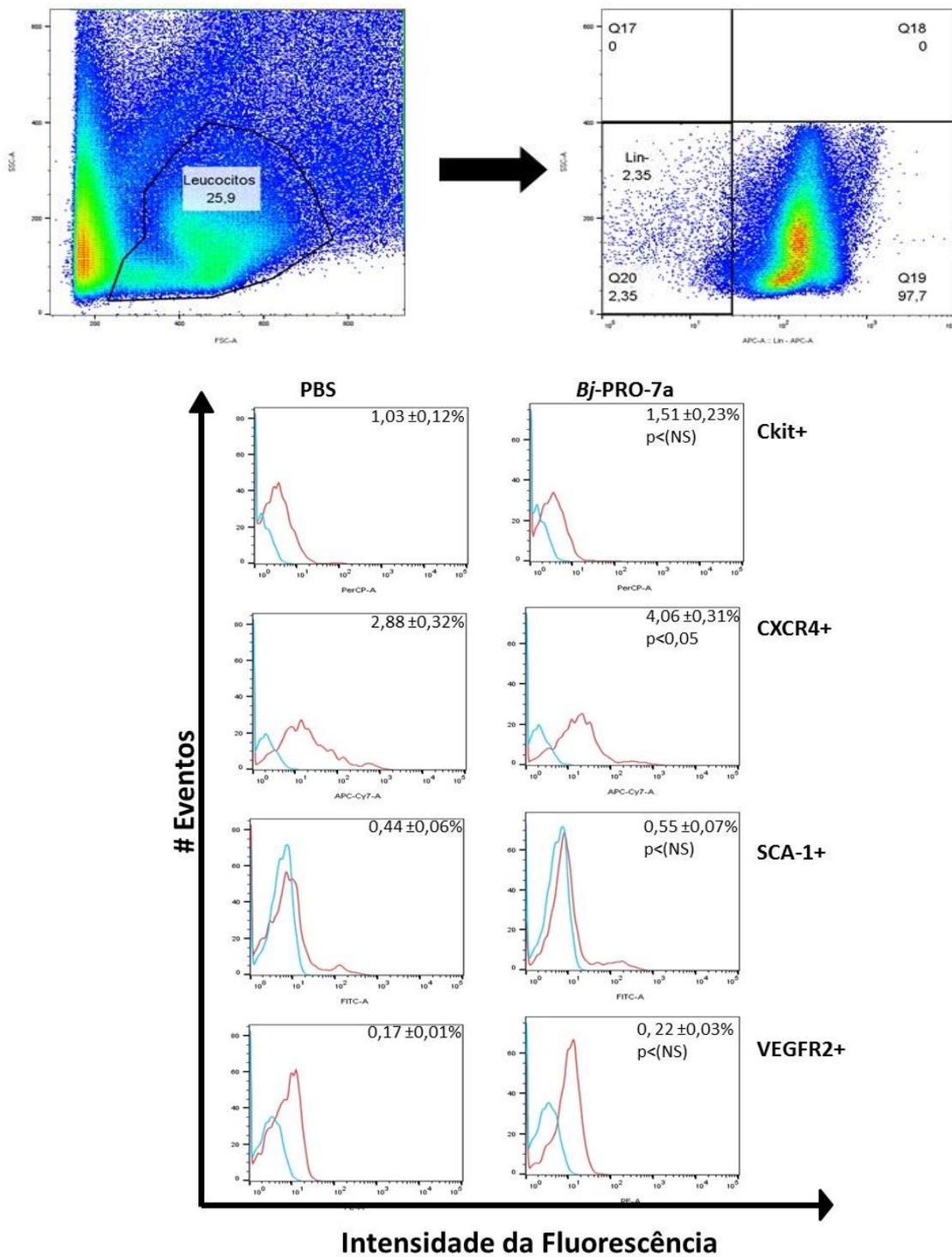


Figura 27: Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo. (A) População de CTAs. (B) População de células negativas para marcadores de linhagem hematopoietica (Lin-). (C) Populações presentes dentre a população de CTAs, em vermelho representa o isótipo controle e em azul o marcador específico.

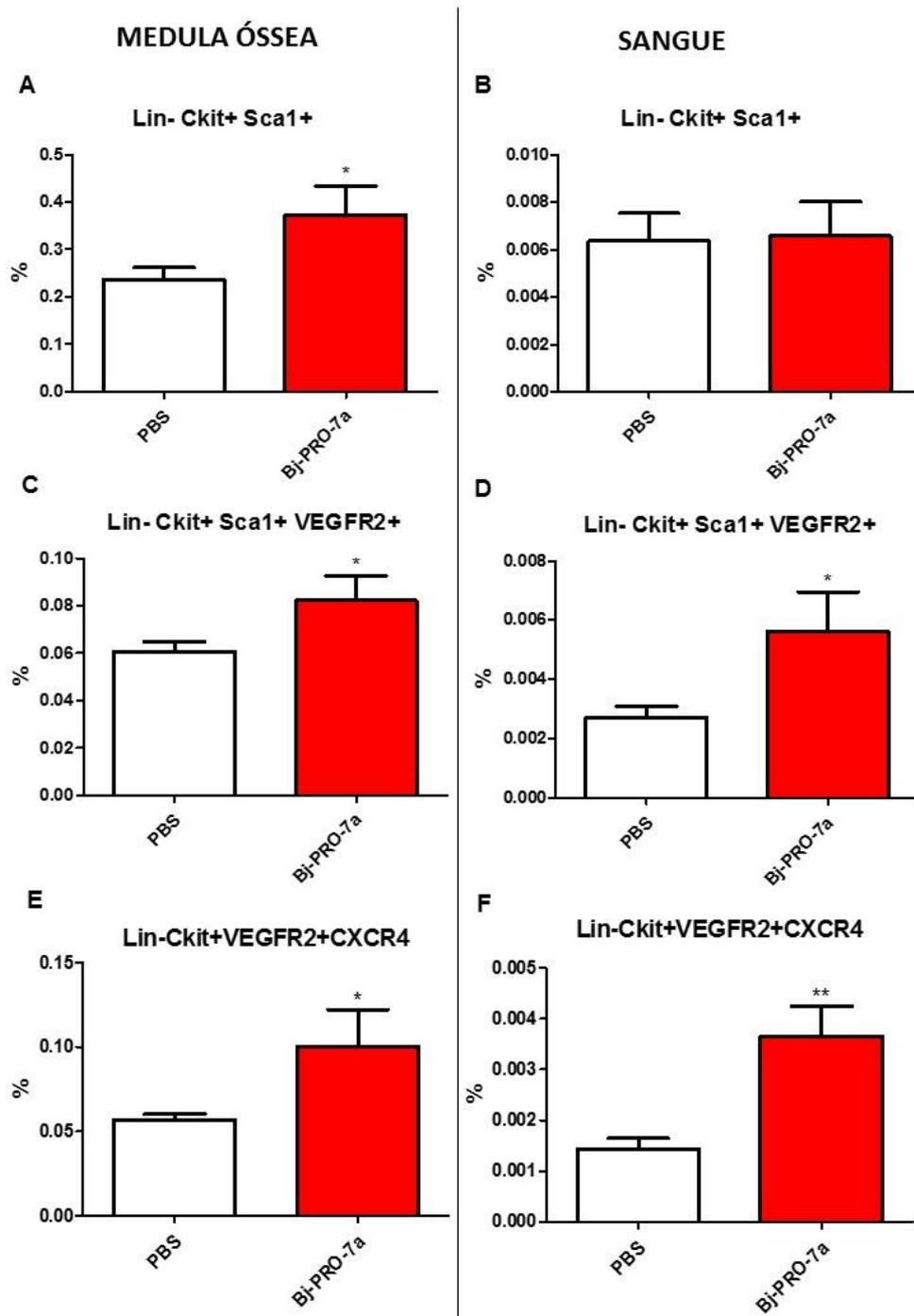


Figura 28: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF. Citometria de fluxo de células da medula óssea e do sangue periférico no 3º dia após OAF. As células foram marcadas com anticorpos específicos contra marcadores de superfície presentes em células progenitoras com potencial angiogênico. (A-B) LSK (Lin-Sca-1^c-kit⁺), (C-D) LSK-VEGFR2⁺, (E-F) Lin-c-kit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺. Os valores estão representados como porcentagem de células encontradas ±e.p.m., n=7/grupo, *p<0.05 (Teste t de Student); de animais tratados com *Bj-PRO-7a* em relação aos animais controles tratados com veículo PBS.

5.20 O peptídeo *Bj-PRO-7a* não estimula a produção de VEGF em músculos de membros posteriores isquêmicos em animais diabéticos.

Avaliamos também os efeitos do *Bj-PRO-7a* nos níveis de VEGF através da técnica de ELISA, no músculo adutor coletado no 3º dia após a OAF, com intuito de investigar possíveis mediadores dos efeitos pró-angiogênicos induzidos pelo *Bj-PRO-7a*. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa nos níveis de VEGF no músculo (PBS 418,9, \pm 33,78; *Bj-PRO-7a* 360,0, \pm 45,50) nos animais tratados com *Bj-PRO-7a* em relação ao controle PBS (Figura 29).

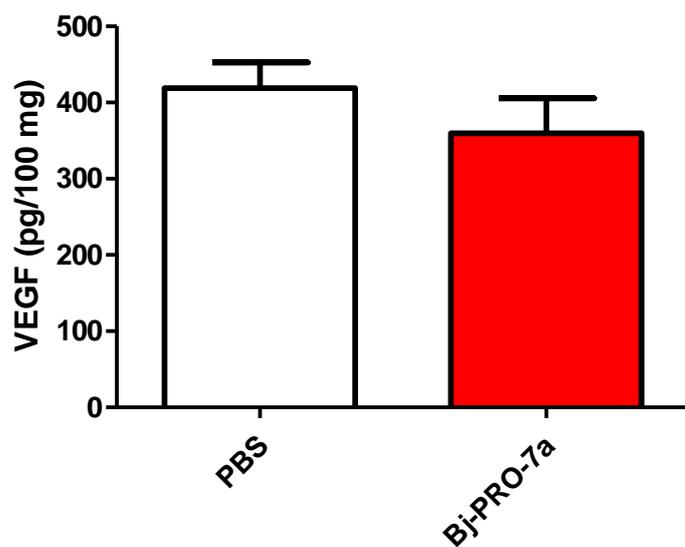
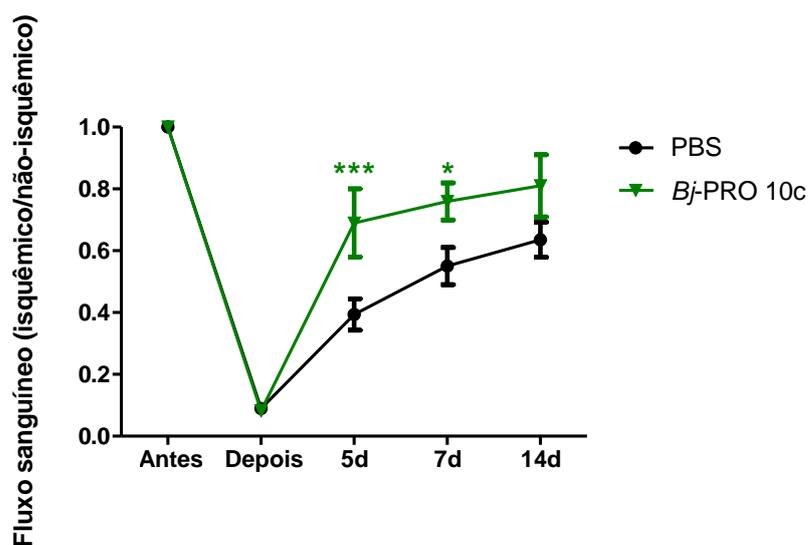


Figura 29: Efeitos do peptídeos *Bj-PRO-7a* sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos. Músculo adutor isquêmico coletado no 3º dia após OAF e utilizado o método de ELISA para dosagem dos níveis de VEGF. Os dados representam a média \pm e.p.m., $n=6$ /grupo, $*p<0,05$; comparado com veículo PBS.

5.21 O peptídeo *Bj*-PRO-10c estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores de animais diabéticos submetidos à OAF

Para avaliarmos os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-10c sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores em animais diabéticos submetidos a OAF, utilizamos a técnica LDPI. Observamos que o fluxo foi aumentado no grupo tratado com *Bj*-PRO-10c nos dias 5 (** $p < 0,001$ PBS $0.39380, \pm 0.05054$; *Bj*-PRO-10c $0.69000, \pm 0.110000$) e 7 (* $p < 0,05$ PBS $0.55000, \pm 0.06000$; *Bj*-PRO-10c $0.76000, \pm 0.060000$) após a OAF, em relação ao grupo controle tratado com veículo PBS (Figura 30).

A**B**

PBS

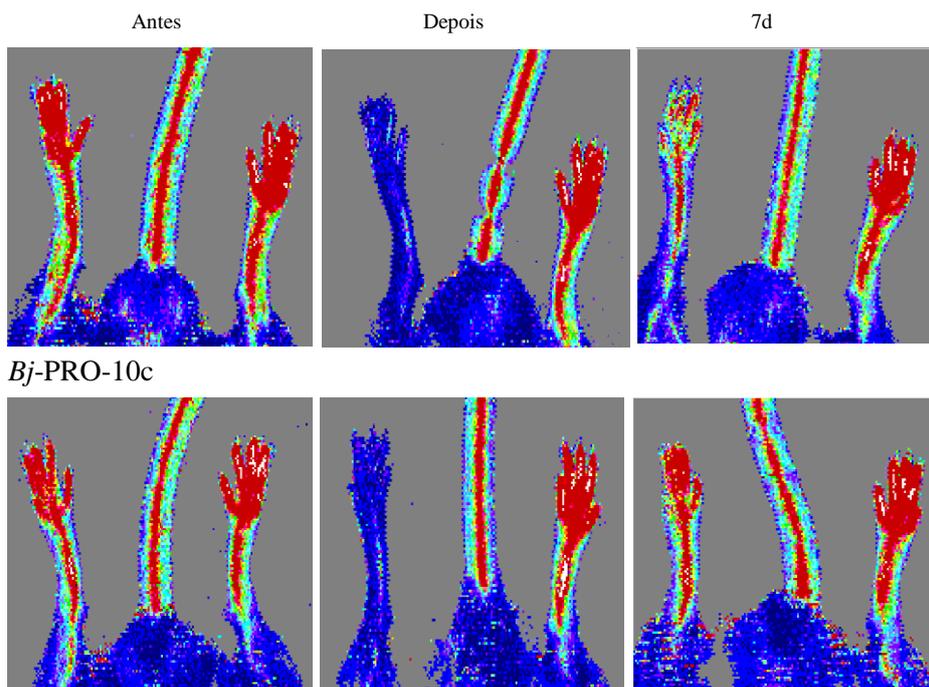


Figura 30: Efeito do peptídeo *Bj-PRO-10c* sobre a recuperação do fluxo sanguíneo de animais diabéticos após OAF. (A) Monitoramento *in vivo* do fluxo sanguíneo nos membros posteriores por LDPI nos animais controle (PBS) e nos animais tratados com *Bj-PRO-10c*. (B) Imagens representativas de LDPI antes, imediatamente após a OAF e no 5d após a OAF e tratamento diário com *Bj-PRO-10c* (71nmol/kg). O teste estatístico utilizado foi two-way ANOVA, seguido de pós- teste Bonferroni. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=8/grupo, ***p<0,001, *p<0,05 comparado com PBS veículo.

5.22 O peptídeo *Bj*-PRO-10c estimula a angiogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-10c na angiogênese, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj*-PRO-10c, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e processados para análises histomorfométricas de cortes corados por H&E. Para isso, foi quantificado o número de capilares e de miócitos por mm². Observamos que houve um aumento significativo na densidade de capilares (PBS 2845, ± 146,2; *Bj*-PRO-10c 3844, ± 287,9), na densidade de miócitos (PBS 2465, ± 126,1; *Bj*-PRO-7a 3188, ± 212,0) e na relação capilar/miócito (PBS 1,083, ± 0,03145; *Bj*-PRO-7a 1,218, ± 0,008157), em relação aos animais que receberam PBS veículo (Figura 31).

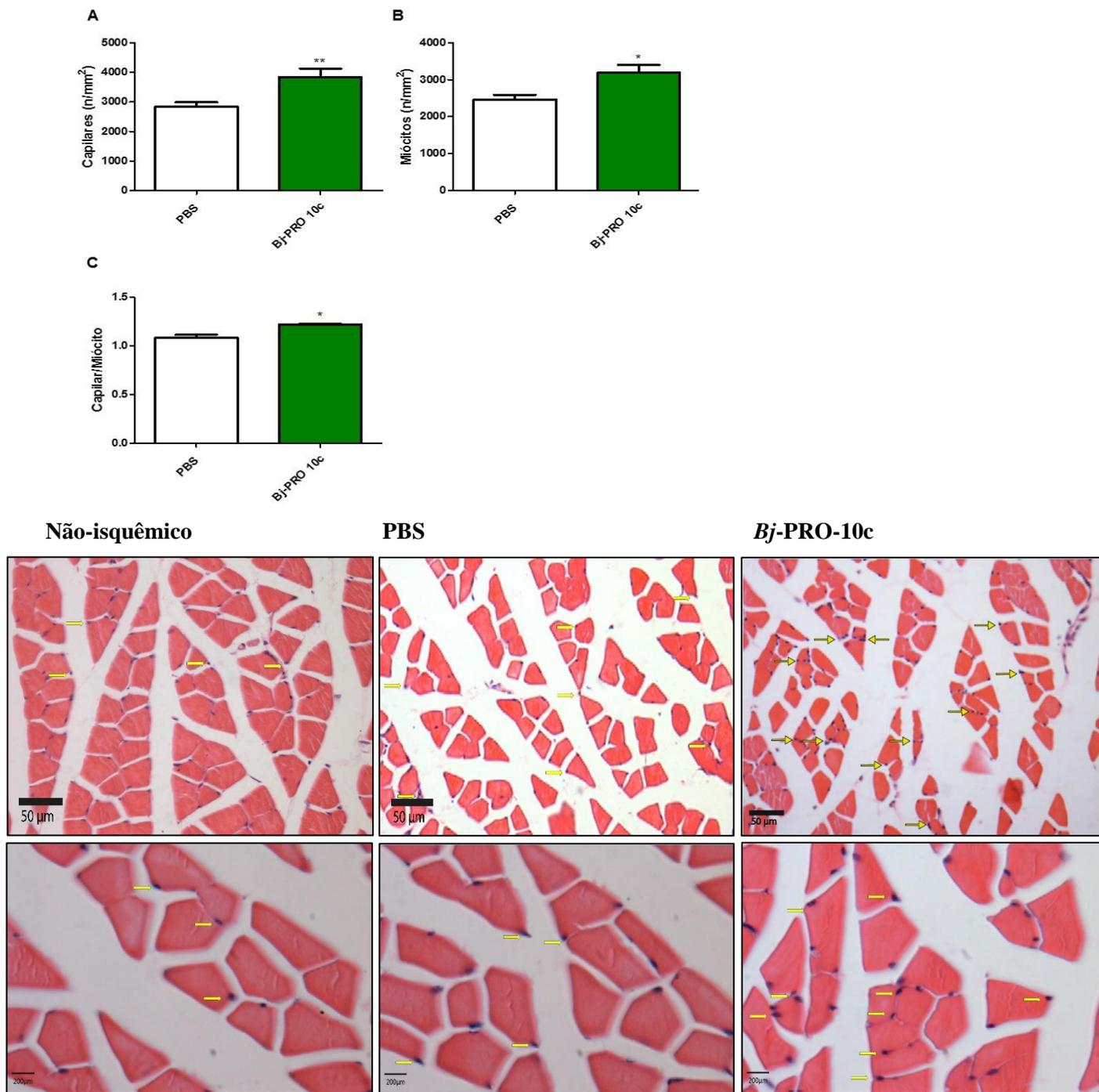


Figura 31: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-10c* sobre a densidade de capilares e miócitos em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos. (A) Densidade de capilares, (B) densidade de miócitos, (C) razão entre o número de capilares e de miócitos no músculo adutor isquemiado de animais 14 dias após a OAF. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=6/grupo, **p<0,01, *p<0,05 comparado com veículo PBS. (D) Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais tratados com PBS veículo ou *Bj-PRO-10c*. As setas indicam capilares sanguíneos entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 400x, barra escala – 50 μ m, 1000x – 200 μ m).

5.23 Efeito do peptídeo *Bj*-PRO-10c sobre a arteriogênese em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-10c na arteriogênese *de novo*, após 14 dias da OAF e do tratamento com *Bj*-PRO-10c, os animais foram eutanasiados e os músculos adutores do membro isquemiado foram coletados e quantificado o número de arteríolas por mm². Observamos um aumento significativo na densidade de arteríolas dos músculos isquemiados de animais tratados com *Bj*-PRO-10c (** $p < 0,05$ PBS 7,125, \pm 0,6105; *Bj*-PRO-10c 11,60, \pm 1,208) em relação ao controle PBS (Figura 32).

Além disso, ao avaliarmos o remodelamento nas arteríolas dos músculos adutores dos membros isquemiados, observamos que não houve diferença significativa na área de luz (PBS 65,91, \pm 9,114; *Bj*-PRO-10c 115,0, \pm 8,347), área de parede vascular (PBS 138,8, \pm 14,73; *Bj*-PRO-10c 159,8, \pm 14,34), e na área vascular total (PBS 216,9, \pm 17,34; *Bj*-PRO-10c 274,8, \pm 10,61), do grupo tratado com *Bj*-PRO-10c em comparação com o grupo controle PBS 14º dia após a OAF (Figura 32). A tabela 4 representa a razão de remodelamento e relação parede/luz, respectivamente, entre os grupos estudados.

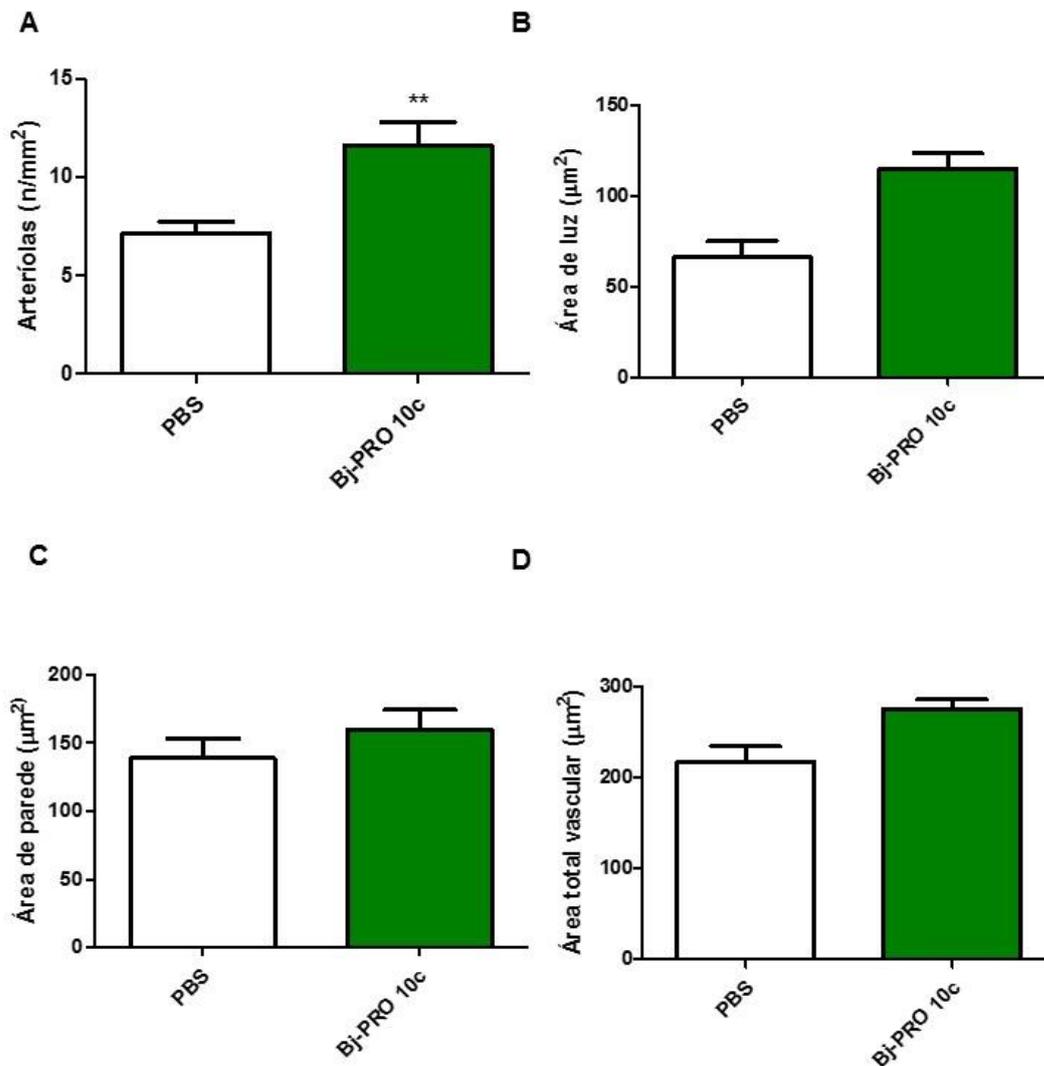


Tabela 4

GRUPO	Razão de remodelamento	Relação parede/luz
SHAM	--	1,930
PBS	1,35	2,363
<i>Bj</i> -PRO-10c	1,77	1,145

Dados expressos em média

Figura 32: Efeitos do peptídeo *Bj*-PRO-10c sobre a arteriogênese *de novo* e remodelamento vascular em músculos isquêmicos de membros posteriores de animais diabéticos. (A) Densidade de arteríolas, (B) área da luz vascular, (C) área de parede vascular e (D) área total vascular no músculo adutor isquemiado no 14º dia após a OAF. Tabela 4 expressa a razão de remodelamento e a relação parede/luz. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=5/grupo, **p<0,01 comparado com veículo PBS.

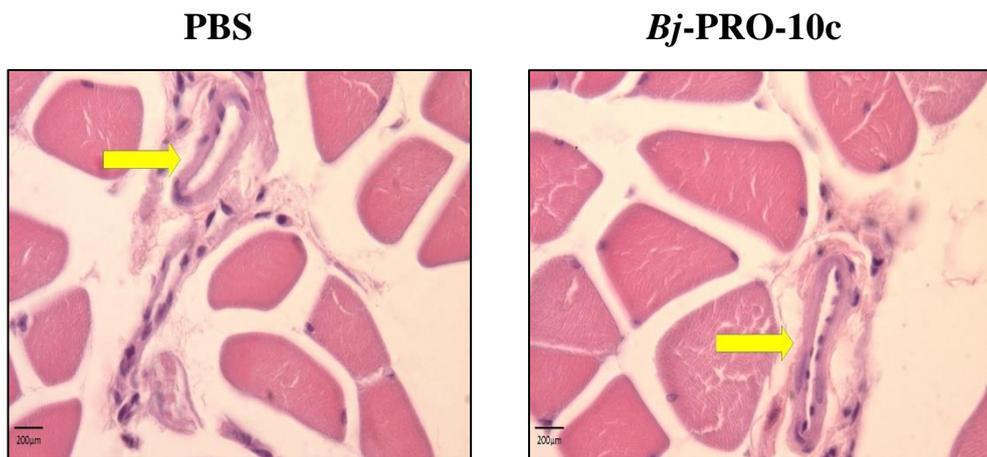


Figura 33: Fotomicrografias em microscopia de luz de músculos adutores isquêmicos de animais diabéticos tratados com *Bj-PRO-10c*. As setas indicam arteríolas entre fibras musculares observado ao 14º dia (corado por Hematoxilina & Eosina, 1000x, barra escala – 200 µm).

5.24 - Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-10c* sobre a mobilização de células-tronco angiogênicas após a OAF

Para avaliar os efeitos do peptídeo *Bj-PRO-10c* na frequência de células-tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e no sangue de animais diabéticos no 3º dia após a OAF, usamos a técnica de citometria de fluxo. Nossos resultados mostram que o *Bj-PRO-10c* aumentou a frequência de células LSK (Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺) na medula óssea (*p<0,05 PBS 0,2373, ± 0,02456; *Bj-PRO-10c* 0,3865, ± 0,05562), mas não no sangue (PBS 0,006354, ± 0,001172; *Bj-PRO-10c* 0,003167, ± 0,0006198) de animais diabéticos. Em relação a subpopulação LSK VEGFR2⁺, o peptídeo *Bj-PRO-10c* aumentou a frequência dessas células na medula óssea (*p<0,05 PBS 0,06070, ± 0,004074; *Bj-PRO-10c* 0,09681, ± 0,01438), mas não teve efeito na mobilização dessas células para o sangue (PBS 0,002724, ± 0,0003667; *Bj-PRO-10c* 0,001893, ± 0,0003925). Além disso, o peptídeo *Bj-PRO-10c* não obteve efeito na frequência de células com fenótipo Lin⁻Sca-1⁺VEGFR2⁺CXCR4 na medula óssea (PBS 0,05669, ± 0,003435; *Bj-PRO-10c* 0,07880, ± 0,01392) quanto no sangue (PBS 0,001421, ± 0,0002246; *Bj-PRO-10c* 0,001071, ± 0,0002563) (Figura 35).

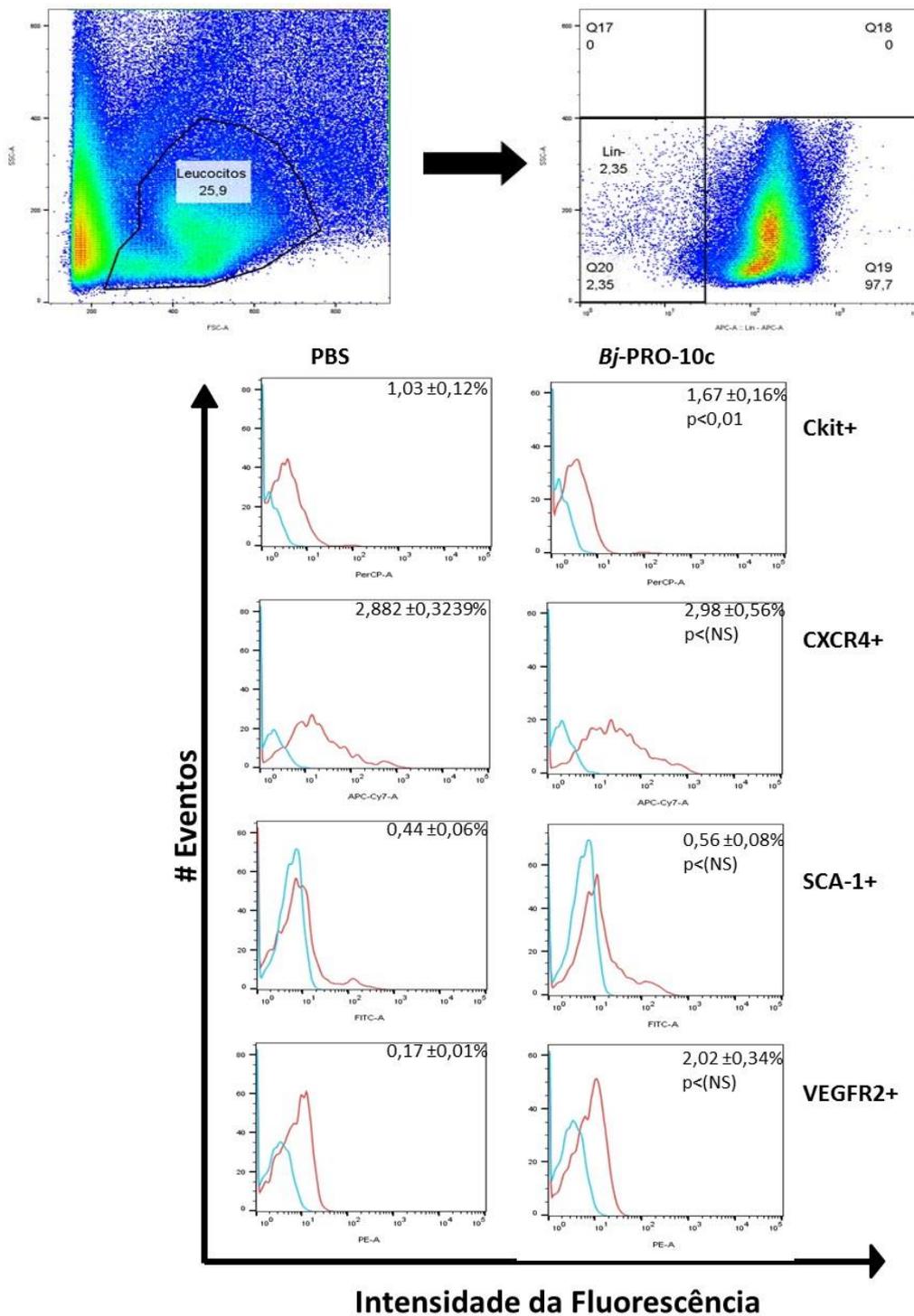


Figura 34: Caracterização fenotípica das CTAs por citometria de fluxo. (A) População de CTAs. (B) População de células negativas para marcadores de linhagem hematopoietica (Lin-). (C) Populações presentes dentre a população de CTAs, em vermelho representa o isótipo controle e em azul o marcador específico.

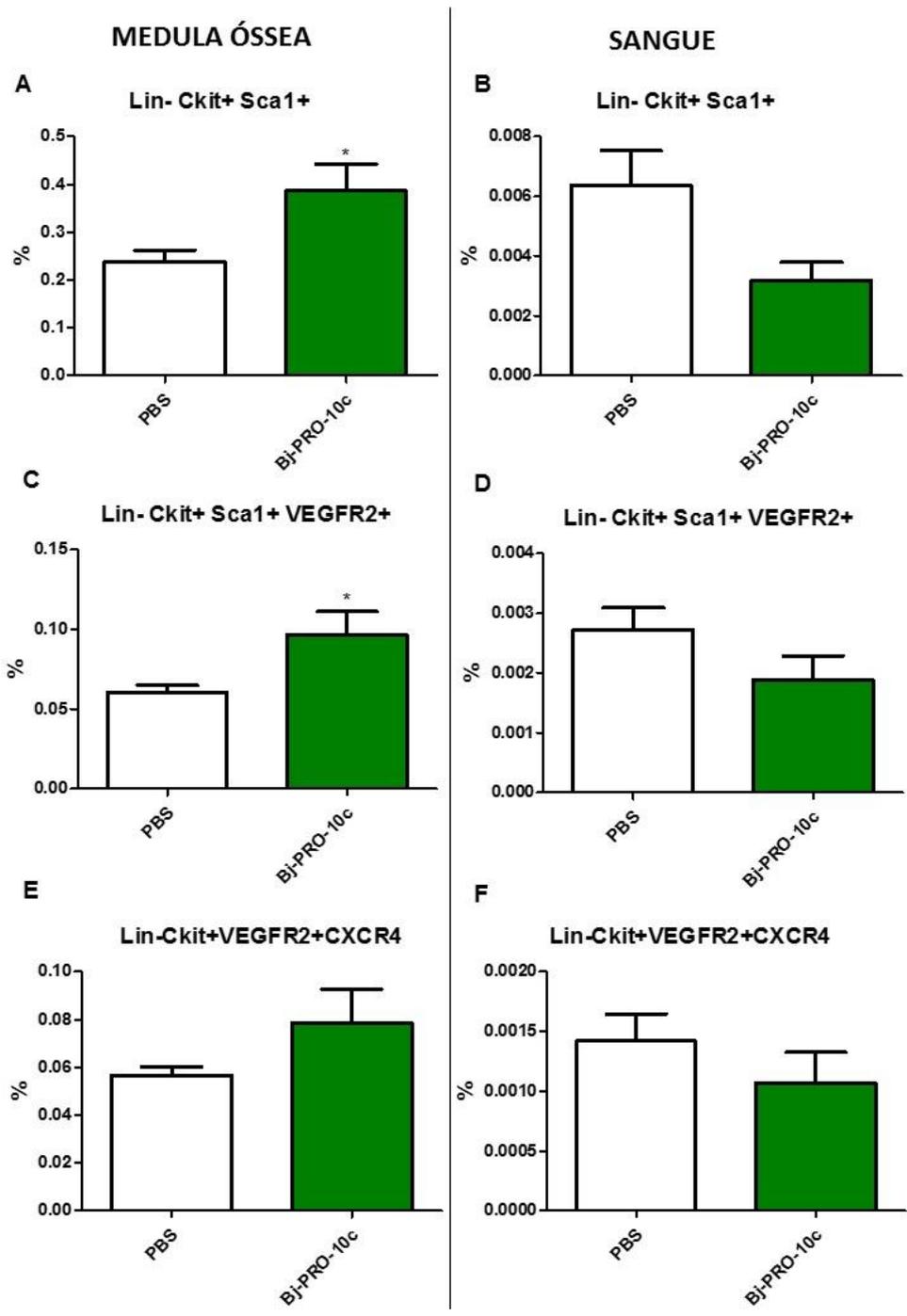


Figura 35: Efeitos do peptídeo *Bj-PRO-7a* sobre CTAs na medula óssea e no sangue periférico de animais normoglicêmicos após a OAF. Citometria de fluxo de células da medula óssea e do sangue periférico no 3º dia após OAF. As células foram marcadas com anticorpos específicos contra marcadores de superfície presentes em células progenitoras com potencial angiogênico. (A-B) LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺), (C-D) LSK-VEGFR2⁺, (E-F) Lin⁻c-kit⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺. Os valores estão representados como porcentagem de células encontradas \pm e.p.m., n=7/grupo, *p<0.05 (Teste t de *Student*); de animais tratados com *Bj-PRO-7a* em relação aos animais controles tratados com veículo PBS.

5.25 O peptídeo *Bj*-PRO-10c não estimula a produção de VEGF em músculos de membros posteriores isquêmicos em animais diabéticos

Avaliamos também os efeitos do *Bj*-PRO-10c nos níveis de VEGF através da técnica de ELISA, no músculo adutor coletado no 3º dia após a OAF, com intuito de investigar possíveis mediadores dos efeitos pró-angiogênicos induzidos pelo *Bj*-PRO-10c. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa nos níveis de VEGF no músculo (PBS – 418,9, \pm 33,78; *Bj*-PRO-10c 343,7, \pm 13,28) nos animais tratados com *Bj*-PRO-10c em relação ao controle PBS (Figura 36).

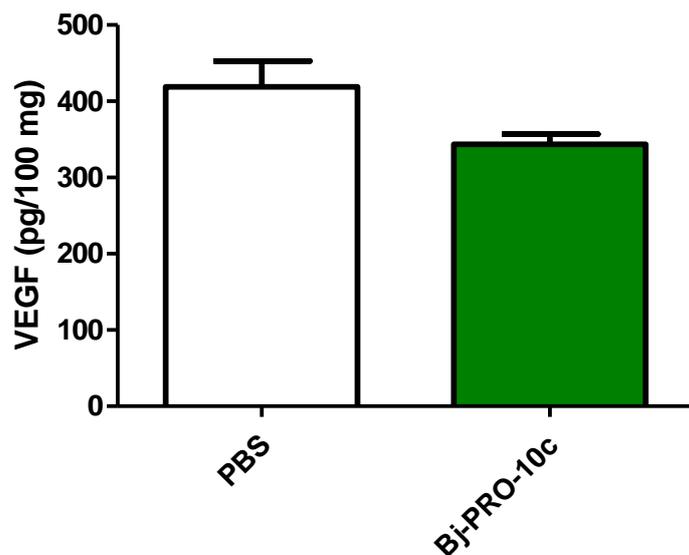


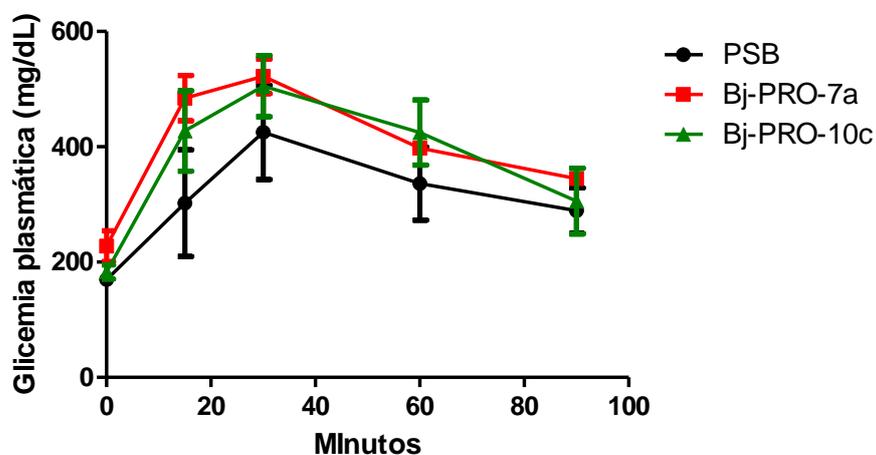
Figura 36: Efeitos do peptídeos *Bj-PRO-10c* sobre a produção de VEGF em animais normoglicêmicos. Músculo adutor isquêmico coletado no 3º dia após OAF e utilizado o método de ELISA para dosagem dos níveis de VEGF. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=6/grupo, *p<0,05; comparado com veículo PBS.

5.26 O peptídeo *Bj*-PRO-7a, mas não *Bj*-PRO-10c, tem efeito na diminuição da glicemia sanguínea em animais diabéticos após a OAF

Por fim, avaliamos a glicemia plasmática dos animais diabéticos submetidos a OAF, realizando o teste de tolerância a glicose (TTG) no 14º dia após a OAF. Nossos dados mostram que não houve diferença na glicemia plasmática nos grupos tratados com *Bj*-PROs comparado com o controle diabético. (Figura 37-A). Além disso, investigamos os efeitos dos peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c nos níveis de glicose plasmática 14º dia após a OAF 24 horas após ao último tratamento com *Bj*-PROs ou veículo. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com *Bj*-PRO-7a, mas não *Bj*-PRO-10c, diminui significativamente os níveis de glicose plasmática no 14d (* $p < 0,05$ PBS $239,8 \pm 25,80$; *Bj*-PRO-7a $132,4 \pm 21,64$; *Bj*-PRO-10c $347,6 \pm 28,84$) após a OAF, quando comparado ao tratado com veículo PBS (Figura 37-B).

Além disso, a tabela 5 demonstra o Delta Δ entre a glicemia no 14 dia e antes do tratamento com os *Bj*-PROs. Nossos dados mostram que a média do Δ dos animais tratados *Bj*-PRO-7a, mas não *Bj*-PRO-10c, é menor quando comparado ao grupo controle PBS.

A



B

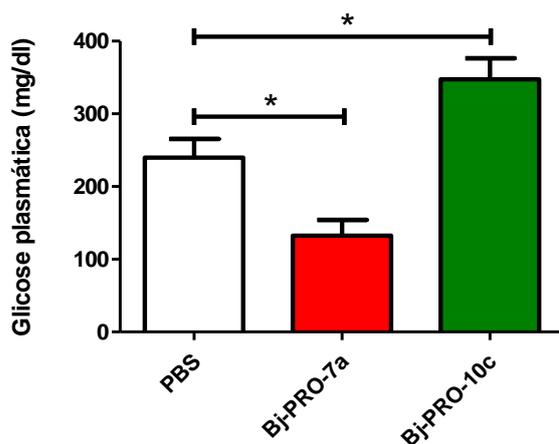


Figura 37: Efeitos do tratamento com os peptídeos *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* sobre a glicemia sanguínea em animais diabéticos após a OAF. (A) Teste de tolerância à glicose (TTG) realizado com animais de jejum de 12h ao final do 14 dia de tratamento com os *Bj-PROs*. (B) Níveis de glicose plasmática 24h após o último tratamento com *Bj-PROs*, sendo que em jejum de 12hrs. (C) Tabela referente ao Delta Δ entre a glicemia no 14 dia e antes do tratamento com os *Bj-PROs* ou veículo. Os dados representam a média \pm e.p.m., n=5/grupo *p<0,05.

Tabela 5 Variação (Δ) entre a glicemia no 14 dia e antes do tratamento com os *Bj-PROs*

	PBS	<i>Bj-PRO-7a</i>	<i>Bj-PRO-10c</i>
Δ	221,5	33*	157,8
	$\pm 18,13$	$\pm 54,22$	$\pm 34,46$

6- DISCUSSÃO

O estreitamento das artérias de forma a dificultar, ou mesmo bloquear, a passagem de sangue aos membros inferiores, é denominada de Doença Arterial Periférica (DAP). Pode ser causada principalmente por aterotrombose e é uma das principais causas de morbidade devido ao declínio funcional associado à perda de membros. Tanto a DAP assintomática, quanto a sintomática, são indicadores importantes de possíveis eventos cardiovasculares e mortalidade (KNOWLES *et al.*, 2007). Evidências atuais sugerem que a DAP representa um risco de doenças cardiovasculares equivalente ou pior que a doença arterial coronariana, o que cria um alerta para intervenções médicas oportunas (SUBHERWAL *et al.*, 2015). Os dados de prevalência e incidência mostram que a DAP é mais comum em idosos, especialmente naqueles com mais de 70 anos de idade. Nos Estados Unidos, a DAP afeta de 8 a 10 milhões pessoas sendo que 20% dos atendimentos ambulatoriais são decorrentes dessa patologia (GO *et al.*, 2013; ROGER *et al.*, 2012). A prevalência da DAP no Brasil gira em torno de 10,5%, sendo que está intimamente ligada ao aumento da idade e fatores de risco como o Diabetes (MAKDISSE *et al.*, 2008).

Aproximadamente 70% dos casos de DAP podem ser explicados pelos estabelecidos fatores de risco como a idade avançada, Diabetes, hipertensão e tabagismo (Meijer *et al.*, 2000). Relata-se que cada 1% de aumento na hemoglobina A1c é correspondente a um aumento de 26% de risco de desenvolver DAP (SELVIN *et al.*, 2004). Pacientes com DAP podem recorrer ao tratamento com fármacos anti-trombóticos ou até mesmo a procedimentos cirúrgicos. No entanto, quando essas terapias não são eficazes ou não são indicados para tais pacientes, muitos desses são submetidos à amputação do membro afetado (NIELS, 2001; NORGREN *et al.*, 2007). Desse modo, a necessidade de estudos inovadores que envolva a terapêutica da DAP é de grande valia.

A angiogênese terapêutica é uma abordagem que vem sendo bastante explorada para o tratamento de doenças vasculares isquêmicas, com potencial para ser usada em pacientes que não têm condições de serem submetidos a procedimentos de revascularização. Com intuito de estimular o crescimento de novos vasos sanguíneos ou o remodelamento de arteríolas colaterais pré-existentes, a angiogênese terapêutica se baseia em estratégias sobretudo de administração de estimuladores de células endoteliais. Dentre estes, por exemplo, estão a terapia celular com células-tronco, cuja eficiência se sustenta pela diferenciação dessas células indiferenciadas em células endoteliais funcionais (vasculogênese) ou até mesmo por ação parácrina de moléculas por elas produzidas sobre células endoteliais presentes na parede de vasos pré-existentes, estimulando o processo de e a terapia farmacológica, pela administração local ou sistêmica de proteínas e fatores de crescimento estimuladores da neovascularização (BARANDON, 2004, LUYT, 2003).

Tem sido observada a ação pró-angiogênica dos inibidores de ECA (iECA) em diversos modelos experimentais. Foi observado, por exemplo, que iECA melhoram a revascularização pós-isquêmica em modelo de isquemia de membros posteriores, tanto em animais saudáveis quanto em animais diabéticos, sendo esses efeitos mediados, pelo menos em parte, via sinalização por receptor B2R de Bradicinina (BK), com consequente estimulação de VEGF e eNOS (EBRAHIMIAN, *et al.*, 2005; FALLAHZADEH *et al.*, 2011, SILVESTRE, 2011). Além disso, foi demonstrado que o uso de iECA aumentou a microcirculação após isquemia induzida por estenose da carótida (HILLER *et al.*, 2010). Os iECA foram desenvolvidos baseado na estrutura dos *Bj*-PROs, peptídeos ricos em prolina isolados da serpente *Bothrops jararaca* na década de 1970, com forte ação anti-hipertensiva, efeitos estes atribuídos à inibição de ECA e à potencialização de BK (FERREIRA *et al.*, 1970; IANZER *et al.*, 2004). Interessantemente, foi demonstrado que alguns dos *Bj*-PROs descobertos na década passada têm efeitos anti-hipertensivos independentes da interação com ECA ou potenciação de BK, sugerindo outros possíveis mecanismos exercidos pelos *Bj*-PROs (IANZER *et al.*, 2004; IANZER *et al.*, 2007). Assim, devido aos potentes efeitos anti-hipertensivos observados dos *Bj*-PROs, a similaridade entre as suas estruturas moleculares com os iECAs, e ainda, seus possíveis mecanismos envolvidos com o sistema calicreína-cininas (IANZER *et al.*, 2007, LAMEU *et al.* 2010), o qual é conhecidamente modulador da angiogênese (STONE *et al.*, 2009; DESPOSITO *et al.*, 2015), resolvemos avaliar os efeitos dos *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c no processo de revascularização do tecido isquêmico submetidos a OAF.

No nosso trabalho, avaliamos primeiramente os efeitos dos *Bj*-PRO-5a no modelo de oclusão da artéria femoral que induz isquemia aguda do membro posterior de animais normoglicêmicos. O nosso primeiro passo foi avaliar o efeito do tratamento crônico durante 14 dias com *Bj*-PRO-5a sobre a recuperação do fluxo sanguíneo. De acordo com os nossos resultados, a recuperação do fluxo sanguíneo foi mais rápida nos animais tratados com os peptídeos *Bj*-PRO-5a em relação ao grupo controle tratado com PBS. Em especial, estudos recentes demonstraram que o *Bj*-PRO 5a promove vasodilatação, porém, não apenas por uma diminuição da formação de angiotensina II e/ou aumento da concentração de BK, mas também pela produção de óxido nítrico (NO), uma molécula conhecidamente angiogênica (GUERREIRO *et al.*, 2009).

Após observarmos que realmente o *Bj*-PRO-5a foi efetivo na melhora da recuperação do fluxo sanguíneo após a OAF, partimos para avaliar os parâmetros angiogênico (densidade capilar, relação/miócito), arteriogênico e arteriogênicos. Nossos dados mostram que o tratamento crônico com *Bj*-PRO-5a aumenta a densidade de capilares e a relação capilar/miócito em músculos isquêmicos quando comparado aos animais controle. Além disso, observamos um aumento na densidade de arteríolas no músculo isquemiado no grupo tratado com *Bj*-PRO-5a, dado que

complementa a hipótese de melhora do fluxo sanguíneo pela arteriogênese *de novo*. Interessantemente, o tratamento com *Bj*-PRO-5a não teve efeito sobre a arteriogênese por remodelamento vascular, os dados referentes à área de luz, área de parede e área total vascular não foram alterados com o tratamento com *Bj*-PRO-5a quando comparado aos animais controle submetidos a OAF. A razão de remodelamento e relação parede/luz baseado nesses dados, reflete em um remodelamento eutrófico positivo, ou seja, não houve alteração na área total vascular, porém houve uma diminuição na relação parede/luz. A arteriogênese pode se dar tanto por aumento de arteríolas ou como por remodelamento vascular, ou seja, artérias colaterais podem aumentar o seu diâmetro pelo remodelamento de sua parede e lúmen, aumentando assim a capacidade de transportar sangue para regiões isquêmicas. Esse processo arteriogênico é estimulado pela a força de cisalhamento aumentada nos vasos colaterais à artéria principal ocluída, levando a um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, o que favorece a adesão de monócitos, que posteriormente, se acumulam em volta das artérias e secretam fatores de crescimento e citocinas (HEILMANN *et al.*, 2002). É interessante ressaltar que esse processo é prejudicado em animais diabéticos (VAN GOLDE *et al.*, 2008; TAMARAT *et al.*, 2003).

Também avaliamos os níveis de VEGF, um dos fatores de crescimento mais importante na estimulação do processo angiogênico (LAWALL *et al.*, 2010) em animais WT e B1RKO. Nossos achados demonstraram um aumento significativo nos níveis de VEGF no músculo adutor isquêmico dos animais WT tratados com *Bj*-PRO-5a, mas não nos animais B1RKO. O que sugere um envolvimento de VEGF nos efeitos estimulatórios do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a revascularização de membros isquêmicos. Além disso, podemos sugerir que os efeitos abolidos nos animais B1RKO evidencia uma dependência do receptor B1R nos efeitos de *Bj*-PRO-5a nos níveis de VEGF no músculo isquemiado. SILVESTRE *et al.* (2001) demonstraram a importância dos receptores de cininas B1R e B2R na angiogênese e liberação de VEGF, porém a natureza exata da interação entre B1R/B2R e VEGF permanece desconhecida (). Li *et al.* (2008) revelaram que os efeitos pró-angiogênicos induzidos pela administração de Imidapril (iECA) pós-isquemia, em partes, é via sinalização B1R/VEGF. De modo interessante, foi mostrado que o tratamento com agonista de B1R restaura os níveis de VEGF após a OAF em animais diabéticos. (DESPOSITO *et al.*, 2015). Além disso, Mejia *et al.* (2015) evidenciaram que a estimulação de B1R em queratinócitos libera VEGF e IL-4.

Há evidências crescentes de que o VEGF tem um papel significativo na hematopoiese e no recrutamento de monócitos e outras células derivadas da medula óssea que podem potencializar o processo de vasculogênico (HATTORI *et al.*, 2002, GERBER, 2002, LUTTUN, 2002). A vasculogênese se refere ao processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de CTAs, que podem originar pela diferenciação em células progenitoras endoteliais (EPCs) e

células-tronco hematopoiéticas, como também pelo auxílio nos processos de angiogênese e arteriogênese por efeito autócrino e parácrino, pela liberação de fatores de crescimento (ASAHARA *et al.*, 2005). CPEs são melhor caracterizadas por sua função e pela combinação da expressão de moléculas de superfície celular específicas (tais como o c-Kit, CD31, Sca-1, fator de crescimento endotelial vascular receptor 2 VEGFR-2 e CXCR4), que caracterizam seu fenótipo (GALE, 1999). LSK é a sigla designada para a linhagem de células Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺, ou seja, células negativas para marcadores de linhagem hematopoiética (Lin⁻) e positivas para ambos os marcadores de células-tronco hematopoiéticas e de CPEs, c-Kit e Sca-1. O marcador c-Kit é um receptor tirosina quinase bem conhecido na função em células-tronco, geralmente associado como marcador de células hematopoiéticas e CPEs derivadas da medula óssea. Esse marcador de superfície parece ser importante na motilidade e sobrevivência de células-tronco (RAFII *et al.*, 2002, BELTRAMI, 2003). Além disso, foi sugerido que, na isquemia de membros, células c-Kit⁺ derivadas da medula óssea são recrutadas para a vasculatura do tecido isquêmico (KWON, 2011).

Outra subpopulação de células que são importantes para neovascularização do tecido isquêmico é a das células Sca-1⁺ derivadas da medula óssea. É bem descrito a importância dessas células Sca-1⁺ na regeneração vascular em resposta a um processo isquêmico, tal fato é explicado talvez pela diferenciação das células Sca-1⁺ derivadas da medula óssea em células de linhagem endotelial. Além disso, sugeriu-se a atuação importante de subpopulações de CPEs com fenótipos c-Kit⁺ e Sca-1⁺ no processo angiogênico, de forma autócrina e parácrina, aumentando a secreção de citocinas pró-angiogênicas como VEGF e CXCL12/SDF-1 e elevando a capacidade proliferativa e de recrutamento no tecido isquêmico (ASAHARA *et al.*, 1999). Outros marcadores também são associados à vasculogênese em tecidos isquêmicos como, por exemplo, VEGFR2, CXCR4 e a molécula de adesão CD31/PECAM (ASAHARA *et al.*, 1999; GALE, 1999).

Perante isso, nos animais tratados com *Bj*-PRO-5a, investigamos a frequência de células-tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e a mobilização dessas células para o sangue. Nossos dados demonstram que o tratamento com *Bj*-PRO-5a estimulou a frequência na medula óssea e a mobilização de CTAs com o fenótipo LSK⁺ VEGFR2⁺ para o sangue. Além disso, também mobilizou células Lin⁻Sca-1⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺ para o sangue. Porém, o tratamento com *Bj*-PRO-5a não alterou a frequência de células LSK ou CD31⁺ tanto na medula óssea como no sangue. De modo interessante, os efeitos estimulatórios do tratamento com *Bj*-PRO-5a sobre as células com fenótipo LSK⁺ VEGFR2⁺ e Lin⁻Sca-1⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺ não foram observados em animais com deleção do receptor B1R de bradicinina (B1RKO), sugerindo que o mecanismo pró-vasculogênico de *Bj*-PRO-5a é dependente do receptor B1R. Não é muito bem elucidado o papel do receptor B1R na estimulação de CTAs, entretanto, corroborando nossos achados, DESPOSITO *et al.* (2015) verificaram que a administração de agonista de B1R não altera os níveis de células LSK na medula óssea, porém, foi observado um aumento no número de células circulantes com

marcador VEGFR2⁺ em animais diabéticos submetidos a OAF, sugerindo que a ativação do receptor B1 é importante para a mobilização dessa população celular.

O sistema renina-angiotensina e o sistema calicreína-cininas desempenham um papel chave na regulação da pressão arterial e da resposta vascular a lesão (SASAKI *et al.*, 2002, WEIR, 2007). Estudos recentes sugerem que angiogênina II e os iECAs estão envolvidos em processos de angiogênese e arteriogênese em modelo de isquemia de membros posteriores *in vivo* (LI *et al.*, 2008). Atualmente, é bem estabelecido que o sistema calicreína-cinina é considerado um modulador da homeostase cardiovascular, nocicepção e inflamação. No entanto, estudos farmacológicos e genéticos sugeriram também sua participação na reparação tecidual e angiogênese terapêutica. Peptídeos-cininas clivados por cininogênios interagem com receptores acoplados a proteína G (B1R e B2R), levando assim células endoteliais liberarem autacóides como NO e prostaglandinas, se tornando importante na resposta natural do hospedeiro permitindo recuperação do fluxo sanguíneo e saúde do tecido (MADEDDU *et al.*, 1997, EMANUELI e MADEDDU 2001, REGOLI *et al.*, 1980, AHLUWALIA, 1999). Além disso, Silvestre *et al.*, 2001 demonstrou em modelo de isquemia de membros, que os efeitos pró-angiogênicos de iECA é mediado por sinalização via B2R associado com uma up-regulação em eNOS, independente da expressão de VEGF. Em animais nocautes para o receptor B1R, foi observado uma reduzida angiogênese após a isquemia de membros (Emanuelli *et al.*, 2001). Curiosamente, em modelo de isquemia de membros, a resposta angiogênica nativa à isquemia foi atenuada pela infusão crônica de um antagonista do receptor B1R, mas não de um antagonista do receptor B2R, e isso poderia ser devido ao papel do receptor B1R na quimiotaxia de leucócitos para o tecido isquêmico bem como pela alteração da sinalização neurogênica (Pesquero *et al.*, 2000).

Deste modo, levando em conta que os *Bj*-PROs serviram de base para o desenvolvimento molecular de iECAs, investigamos se os mecanismos estimulatórios pró-angiogênicos de *Bj*-PRO-5a poderia estar ligado ao sistema calicreína-cininas, assim avaliamos a recuperação do fluxo sanguíneo e quantificamos a densidade capilar e de arteríolas nos músculos isquêmicos. Para isso, usamos animais knockout para o receptor B1R e B2R de bradicinina e administramos o *Bj*-PRO-5a cronicamente durante 14d. Os dados demonstraram que o tratamento com *Bj*-PRO-5a estimulou a revascularização de membros isquêmicos de animais B2RKO submetidos a OAF, melhorando a recuperação do fluxo, aumentando o número de capilares e arteríolas. Diante disto, pode-se sugerir que os efeitos pró-angiogênicos do *Bj*-PRO-5a são independentes da sinalização via receptor B2R de bradicinina, excluindo a hipótese do receptor B2R ser uma possível via pró-angiogênica induzida por *Bj*-PRO-5a. Interessantemente, os efeitos estimulatórios pró-angiogênicos e pró-arteriogênicos de *Bj*-PRO-5a foram abolidos em animais B1RKO, não tendo efeito sobre a recuperação do fluxo sanguíneo, sobre a densidade de capilares e arteríolas no

músculo isquemiado após a OAF. Esses dados sugerem que os efeitos angiogênicos e arteriogênicos de *Bj*-PRO-5a é dependente do receptor B1R.

Nossos dados referentes a abolição dos efeitos pró-angiogênicos de *Bj*-PRO-5a na recuperação do fluxo sanguíneo e densidade de vasos, juntamente com os resultados referentes a abolição dos efeitos estimulatórios nos níveis de VEGF e na mobilização de CTAs para o sangue periférico em animais B1RKO, sugerem a dependência desse receptor B1R para os efeitos angiogênicos, arteriogênicos e vasculogênicos para indução de uma melhora na revascularização do tecido isquemiado após a OAF.

A ação pró-angiogênica exercida por VEGF é mediada pela sinalização óxido nítrico-monofosfato de guanosina cíclica (NO-cGMP), importante via que desencadeia uma ativação da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e pela up-regulation de FGF-2 no endotélio, estimulando a migração e proliferação de células endoteliais em tecido isquêmico (MUROHARA *et al.*, 1998). De fato, diversos trabalhos mostram o papel fundamental de NO como um mediador endotelial no remodelamento vascular e angiogênese (MORBIDELLI *et al.*, 1996, FLEMING *et al.*, 2003, BUSSOLATI *et al.*, 2001, MUROHARA *et al.*, 1998). Por exemplo, após a indução de isquemia em membros posteriores de camundongos é observado um aumento da expressão de RNAm eNOS no músculo isquêmico. Além disso, o tratamento com inibidor de NOS (L-NAME) diminuiu a perfusão sanguínea após a OAF em ratos. Esses efeitos implicam que, a baixa disponibilidade de NO induzido por L-NAME, diminui a ação de VEGF levando a uma piora na revascularização. (CONTRERAS *et al.*, 2006; ZICHE *et al.*, 1992). Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro*, a importância de NO para migração e proliferação de células endoteliais (NOIRI *et al.*, 1998; MUROHARA *et al.*, 1998). Além disso, relata-se que a BK têm efeitos angiogênicos devido à ativação do receptor B1R, que induz um aumento de bFGF pela ativação endógena de NOS (PARENTI *et al.*, 2001). Além disso, os efeitos pró-angiogênicos induzidos por iECA envolve a via de cininas B1/B2R e produção de NO (LI, *et al.*, 2008).

Considerando que o NO é uma molécula pró-angiogênica bem estabelecida, resolvemos avaliar se haveria um possível envolvimento ou participação de NO nos efeitos estimulatórios induzidos por *Bj*-PRO-5a. Para isso, animais WT foram tratados com *Bj*-PRO-5a e concomitantemente com L-NAME. O L-NAME é um inibidor não-seletivo de NOS (óxido nítrico sintase), sendo que a inibição dessa enzima leva a uma diminuição abrupta na produção de NO (PALMER, 1989). Interessantemente, nossos achados mostraram que o tratamento com *Bj*-PRO-5a concomitantemente com L-NAME melhorou a recuperação do fluxo sanguíneo de forma tardia, sugerindo um papel importante de NO nas fases iniciais da recuperação do fluxo sanguíneo. Além disso, observamos um aumento na relação capilar/miócito e na densidade de capilares. Porém, não foi visto aumento na densidade de arteríolas. Estudos em modelo de

isquemia de membros posteriores, revelaram que o tratamento com L-NAME afeta a circulação em artérias colaterais, diminuindo o fluxo (PRIOR, *et al.*, 2003). Em conjunto, esses resultados sugerem que os efeitos pró-angiogênicos de *Bj*-PRO-5a dependem parcialmente de NO, entretanto, os efeitos pró-arteriogênicos induzidos por *Bj*-PRO-5a parecem ser dependentes da produção de NO.

Por fim, com intuito de investigar possíveis mecanismos estimulatórios de *Bj*-PRO-5a, avaliamos *in vitro* a migração e proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em condições de normóxia e hipóxia. Nossos achados mostram o tratamento com *Bj*-PRO-5a, a capacidade de migração foi maior nas células tratadas com *Bj*-PRO-5a quando comparada as células tratadas com veículo PBS em condições de normoxia e hipóxia. Além disso, quando investigamos o efeito de *Bj*-PRO-5a sobre a proliferação dessas células, verificamos que em condições de normoxia, mas não de hipóxia, houve um aumento na capacidade de proliferação das células tratadas com *Bj*-PRO-5a quando comparadas as células tratadas com veículo PBS. Assim, nossos dados sugerem que *Bj*-PRO-5a tem efeito por si só, na migração de células endoteliais, em condições de normoxia e hipóxia, independente da presença ou ausência de estímulos e fatores de crescimento (EGM-2, hipóxia). Entretanto, os efeitos estimulatórios de *Bj*-PRO-5a na proliferação de células endoteliais foi observado apenas em condição de normoxia-EBM, ou seja, um efeito direto sem a necessidade da presença de estímulos ou fatores de crescimento. Provavelmente o efeito não foi visto na presença de estímulos, pois a estimulação da hipóxia já aumenta consideravelmente a proliferação das células endoteliais.

Tomados nossos dados em conjunto, sugerimos que *Bj*-PRO-5a têm efeitos estimulatórios pró-angiogênicos que melhoram a recuperação do fluxo sanguíneo em animais submetidos a OAF. Esses efeitos parecem envolver a atividade do receptor B1R de cininas e a estimulação da produção de VEGF, que por sua vez, aumenta a mobilização de CTAs da medula ossea para o sangue periférico, como também estimula a migração e proliferação de células endoteliais maduras. Além disso, esses efeitos são dependentes parcialmente de NO e independentes do receptor B2R de bradicinina.

Na segunda parte do trabalho, baseado nos resultados com *Bj*-PRO-5a obtidos nesse trabalho e nosso trabalho de mestrado onde observamos que os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c têm efeito pró-angiogênico e promovem a revascularização de membros posteriores por aumento da angiogênese e da arteriogênese em camundongos saudáveis (normoglicêmicos) (PRADO, 2013), resolvemos avaliar se os *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c possuem efeito terapêutico em modelo pré-clínico de DAP associada ao Diabetes.

De maneira interessante, nossos resultados demonstraram uma melhora na recuperação do fluxo sanguíneo e aumento significativo na angiogênese dos membros posteriores isquemiados de animais diabéticos tratados com ambos os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c, mas não com

Bj-PRO-5a. Um grande número de estudos mostraram que a angiogênese e arteriogênese do membro isquêmico sob condições diabéticas é defeituosa, o que pode ser uma importante razão pela qual a consequência de oclusão de vasos sanguíneos em pacientes com diabetes é mais grave do que a de pacientes não-diabéticos. A patogênese do diabetes sobre a angiogênese prejudicada ainda não está bem clara, sendo que a hipóxia crônica é um fator resultante importante em pacientes diabéticos com DAP (CHUNG *et al.*, 2006, PUGH e RATCLIFFE, 2003).

Quando avaliamos o tratamento com os peptídeos *Bj*-PRO-7a e 10c sobre a arteriogênese, observamos efeitos distintos. O tratamento com *Bj*-PRO-10c aumentou o número de arteríolas no músculo adutor isquemiado em animais diabéticos após a OAF, mas não no remodelamento vascular (remodelamento eutrófico positivo). Ao contrário do que o tratamento com *Bj*-PRO-7a, que não obteve efeito sobre o número de arteríolas, mas teve efeito sobre o remodelamento vascular, que se observou com um aumento na área de luz, área de parede e na área vascular total de arteríolas (remodelamento hipertrófico positivo). Estudos revelaram que o processo arteriogênico é deficiente no DM em condições de isquemia, devido a baixa capacidade de remodelamento vascular induzido pelo aumento da força de cisalhamento em artérias colaterais, possivelmente pela diminuição da biodisponibilidade de NO em condições de hiperglicemia (TAMARAT *et al.*, 2003; ABACI *et al.*, 1999). Em critério comparativo, quando avaliamos os efeitos dos *Bj*-PRO-7a e 10c sobre a arteriogênese em animais saudáveis, observamos que o *Bj*-PRO-7a aumentou o número de arteríolas, como também a área de luz e área de parede, enquanto o *Bj*-PRO-10c aumentou também o número de arteríolas e área de parede, mas não aumentou área de luz e área total (PRADO, 2013).

Em doenças metabólicas, como DM, tanto em modelos animais quanto em humanos, é bem estabelecido a consequência prejudicada da função de CTAs na medula óssea (WESTERWEEL *et al.*, 2013; DESOUZA, 2013). Foi demonstrado que a capacidade de mobilização de células Lin⁻cKit⁺Sca1⁺ (LSK) e EPCs em animais diabéticos é dificultada (ALBIERO *et al.*, 2013; CERADINI *et al.*, 2004). Ratos com DM-1 induzidos por STZ, mostraram uma capacidade defeituosa de fosforilação de eNOS na medula óssea, diminuindo EPCs circulantes e ainda diminuindo a expressão de CXCR4/CXCL12 em feridas cutâneas, levando a um desequilíbrio no recrutamento de EPCs (GALLAGHER *et al.*, 2007). DM-1 também promove concentrações reduzidas de CXCL12 no miocárdio e resultante diminuição no recrutamento de EPCs (SHIGETA *et al.*, 2012). Além disso, baixos níveis de calcireína tissular humana em CTAs é observado em pacientes diabéticos. De forma interessante, a expressão do receptor B2R em CTAs de humanos diabéticos é fundamental para a capacidade de mobilização dessas células para o sangue periférico (SPINETTI *et al.*, 2011).

Dessa forma, resolvemos avaliar possíveis mecanismos de ação pró-angiogênico que explicasse tais fenômenos envolvidos na melhora da recuperação do fluxo sanguíneo, e indução de angiogênese e arteriogênese nos animais tratados com *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* investigamos a frequência de células-tronco angiogênicas (CTAs) na medula óssea e a mobilização dessas células para o sangue. Nossos dados mostram que o *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* aumentou a frequência de células LSK (Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺) na medula óssea, mas não no sangue de animais diabéticos. Em relação a subpopulação LSK-VEGFR2⁺, os peptídeos *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* aumentaram a frequência dessas células na medula óssea, mas apenas o *Bj-PRO-7a* teve efeito na mobilização dessas células para o sangue. Além disso, apenas *Bj-PRO-7a*, mas não *Bj-PRO-10c*, aumentou a frequência de células com fenótipo Lin⁻Sca-1⁺VEGFR2⁺CXCR4⁺ na medula óssea; *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* não alteraram a frequência de células CD31⁺ na medula óssea ou no sangue de animais diabéticos.

Interessantemente, dados do nosso trabalho de mestrado evidenciam que apenas o peptídeo *Bj-PRO-10c*, mas não o *Bj-PRO-7a*, estimula a mobilização de CTAs da medula óssea para o sangue periférico após a OAF em camundongos saudáveis submetidos a OAF (normoglicêmicos) (PRADO, 2013), ao contrário do visto em animais diabéticos. No presente estudo, sugerimos que em condições de hiperglicemia e consequente angiopatia diabética, o peptídeo *Bj-PRO-7a* tem efeito importante sobre a mobilização de CTAs na medula óssea para o sangue. Enquanto isso, o *Bj-PRO-10c* teve efeito nas CTAs derivadas da medula óssea, mas não teve efeito sobre a mobilização dessas células para o sangue. Aparentemente, *Bj-PRO-10c* não tem efeito perante a prejudicada capacidade de recrutamento dessas células em condições de hiperglicemia.

Em condições de hiperglicemia, redução na expressão de VEGF causa uma piora na angiogênese e disfunção endotelial (MARUYAMA *et al.*, 2007). Além disso, estudos mostraram a deficiência da biodisponibilidade de NO pela diminuição da expressão de eNOS, e uma menor capacidade de migração de CTAs induzidas por VEGF, em modelo de DM-1 induzido por estreptozotocina após a OAF (YAN *et al.*, 2009). Sobretudo, quando avaliamos os níveis de VEGF nos músculos isquemiados de animais diabéticos submetidos a OAF, observamos que ambos os peptídeos *Bj-PRO-7a* e *10c* não tem efeito sobre a produção de VEGF, ao contrário visto pelo menos com *Bj-PRO-10c*, que em animais normoglicêmicos submetidos a OAF, aumenta a produção de VEGF em músculos isquemiados (PRADO, 2013). Assim, os dados sugerem que o VEGF não está entre os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos na melhora da revascularização e angiogênese em animais diabéticos induzidos pelos *Bj-PRO-7a* e *10c*.

Por fim, com intuito ainda de investigar possíveis mecanismos pelos quais ambos *Bj-PRO-7a* e *10c* induzem melhora na revascularização e angiogênese em animais diabéticos submetidos a OAF, avaliamos os efeitos desses peptídeos sobre a intolerância à glicose induzida pelo DM1, como também a glicemia plasmática nesses animais. No teste de tolerância à glicose,

nossos resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos tratados com *Bj*-PROs ou PBS. Curiosamente, quando avaliamos a glicemia (em jejum) 24h após o último tratamento com *Bj*-PROs, observamos que o tratamento com *Bj*-PRO-7a, mas não *Bj*-PRO-10c, diminuiu significativamente os níveis de glicose plasmática. Levando-se em conta que, no modelo de Diabetes induzidos por STZ, a tendência da hiperglicemia é aumentar ao longo dos dias, como pôde ser observado no grupo controle tratado com PBS e *Bj*-PRO-10c, mas não naquele tratado com *Bj*-PRO-7a, nossos dados sugerem que o tratamento com *Bj*-PRO-7a, embora não altere a intolerância à glicose dos animais com DM1, tem ação hipoglicemiante nesse modelo. De fato, observamos que os animais tratados com *Bj*-PRO-7a apresentam melhor controle da glicemia, embora ainda apresentem-se diabéticos, quando comparados com os animais diabéticos do grupo controle que recebeu apenas a solução veículo.

Resultados similares são encontrados em estudos que avaliaram a administração de insulina ou análogos de insulina sobre a glicemia de indivíduos diabéticos. Os achados desses trabalhos demonstram claramente que o tratamento com insulina ou seus análogos, reflete em uma diminuição da glicemia sanguínea, de forma temporária, sem acarretar em cura definitiva da doença (HAVELUND et al., 2004; RIDDLE et al., 2003; DECKERT et al., 1980). Além disso, trabalhos que avaliaram o efeito do tratamento com insulina em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos a isquemia de membros, demonstraram que o tratamento com a insulina melhorou o restabelecimento do fluxo sanguíneo, através da estimulação da mobilização de EPCs da medula óssea para o sangue, como também contribuiu para a neovascularização através da via VEGF/eNOS (DONG et al., 2011; FADINI et al., 2006).

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c estimulam a revascularização de membros posteriores isquemiados em camundongos com DM-1 induzida por STZ, via estimulação da angiogênese e da arteriogênese. Em particular, o *Bj*-PRO-7a também estimulou a mobilização de CTAs para o sangue. Além disso, o peptídeo *Bj*-PRO-7a, mas não o *Bj*-PRO-10c, parece ter efeito hipoglicemiante no modelo experimental estudado.

7- SUMÁRIO

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que:

- O tratamento sistêmico diário com o peptídeo *Bj*-PRO-5a estimula a revascularização de membros posteriores isquemiados em camundongos normoglicêmicos, mas não em animais hiperglicêmicos, via estimulação da angiogênese e arteriogênese, como também via estimulação da mobilização de CTAs para o sangue;
- Os efeitos estimulatórios do peptídeo *Bj*-PRO-5a sobre a revascularização dos membros isquemiados parecem ser dependentes da ativação do receptor B1R, mas não o receptor B2R de Bradicinina, e parcialmente dependentes da produção de NO;
- Ambos os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c estimulam a revascularização de membros posteriores isquemiados em camundongos com DM-1 induzida por STZ, via estimulação da angiogênese e da arteriogênese e, em particular o *Bj*-PRO-7a, também pela mobilização de CTAs para o sangue;
- Os efeitos pró-angiogênicos do *Bj*-PRO-7a, mas não do *Bj*-PRO-10c, parecem estar relacionados a uma atividade hipoglicemiante daquele peptídeo.

Tabela 6

Representação da avaliação dos efeitos do tratamento com *Bj*-PROs em animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos submetidos a OAF.

	Normoglicêmicos	Hiperglicêmicos		
	<i>Bj</i> -PRO-5a	<i>Bj</i> -PRO-5a	<i>Bj</i> -PRO-7a	<i>Bj</i> -PRO-10c
Fluxo sanguíneo	↑	Não altera	↑	↑
Angiogênese	↑	---	↑	↑
Arteriogênese de novo	↑	---	Não altera	↑
Arteriogênese por remodelamento vascular	Não altera <u>Eutrófico positivo</u>	---	↑ Hipertrófico positivo	Não altera <u>Eutrófico positivo</u>
Mobilização de células-tronco <u>angiogênicas</u>	↑	---	↑	Não altera
VEGF	↑	---	Não altera	Não altera
TTG	---	---	Não altera	Não altera
Glicemia	---	---	↓	↑

8- CONCLUSÃO

Conclusão geral:

Nossos dados sugerem que o *Bj*-PRO-5a estimula a recuperação de membros posteriores isquêmicos de camundongos normoglicêmicos, mas não daqueles com DM1. Esses efeitos parecem envolver a atividade do receptor B1R de cininas e são parcialmente dependentes da liberação de óxido nítrico, mas são independentes da atividade do receptor B2R. Além disso, os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c são capazes de estimular a revascularização de membros posteriores isquêmicos em camundongos com DM1.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abaci A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinç H, Ergin A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*. 1999 May 4; 99(17):2239-42.

Adler AI, Stevens RJ, Neil A et al. UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25: 894-9.

Ahluwalia A, Perretti M. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1. *Trends Pharmacol Scie*. 1999; 20: 100–103.

Albiero M, Avogaro A, Fadin GP. Restoring stem cell mobilization to promote vascular repair in diabetes. *Vascular Pharmacology* 58 (2013) 253–258.

Althouse AD, Abbott JD, Forker AD et al. Risk factors for incident peripheral arterial disease in type 2 diabetes: results from the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation in type 2 Diabetes (BARI 2D) Trial. *Diabetes Care*. 2014; 37: 1346-52.

Amano K, Matsubara H, Iba O, Okigaki M, Fujiyama S, Imada T, et al. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 2003; 41: 156-62.

American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 3333–3341.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbicher B, Schatterman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964– 967. [PubMed: 9020076].

Barandon L, Leroux L, Dufourcq P, Plagnol P, Deville C, Duplaa C, Couffinhal T. Gene therapy for chronic peripheral arterial disease: what role for the vascular surgeon? *Ann Vasc Surg*. 2004;18(6):758-65.

Barcelos LS, Cécile Duplaa, Nicolle Kränkel, Gallia Graiani, Gloria Invernicionica, Andreas Simm, Paola Campagnolo, Giuseppe Mangialardi, Lara Stevanato, Giulio Alessandri, Costanza Emanuelli, and Paolo Madeddu. Human CD133+ Progenitor Cells Promote the Healing of Diabetic Ischemic Ulcers by Paracrine Stimulation of Angiogenesis and Activation of Wnt Signaling. *Circ Res*. 2009 May 8; 104(9): 1095–1102.

Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 121: 43-55.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002;287:2570-81.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763-76.

Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant*. 2008; 17(8):955-68.

Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, and Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 159: 993–1008, 2001.

Carl de Luca and Jerrold M. Olefsky. Inflammation and Insulin Resistance. November 29 2007.

Carmeliet P, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nat. Med.* 6 (2000) 389–395.

Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):193-200.

Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9, 653–660 (2003). Swift, M. R. & Weinstein, B. M. Arterial–venous specification during.

Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., Gurtner, G.C., 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 10, 858–864.

Chung AW, Hsiang YN, Matzke LA, MCmanus BM, Van Breemen C, Okon EB. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circ Res* 2006; 99: 140-148.

Clozel JP, Kuhn H, Hefti F. Effects of chronic ACE inhibition on cardiac hypertrophy and coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats with developed hypertension. *J Hypertens*. 1989;7:267–275.

Collinson D. J., Donnelly R. Therapeutic Angiogenesis in Pheripheral Arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation. *Eur J. Vascular Surg*, 2004;9-23.

Contreras DL, Vargas Robles H, Romo E, Rios A, Escalante B. The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. *Pharm Ther* 2006;112: 553-63.

Cooke JP and Losordo DW. Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia. *Circulation Research*. 2015;116:1561-1578.

Cotton J, Hayashi MA, Cuniasse P, Vazeux G, Ianzer D, de Camargo AC, and Dive V (2002) Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 41:6065–6071.1199400.

Coultas, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J. Review Article Endothelial cells and VEGF in vascular development (2005). *Nature*. 438. 937-945.

Deckert T, Intermediate-acting insulin preparations: NPH and lente, *Diabetes Care* 3 (1980) 623-626.

Desposito D, Potier L, Chollet C, Gobeil Jr G et al. Kinin Receptor Agonism Restores Hindlimb Postischemic Neovascularization Capacity in Diabetic Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 352:218–226, February 2015.

Di Stefano R, Limbruno U, Barone D, Balbarini A. Angiogenesi terapeutica nell'ischemia critica degli arti inferiori. Revisione della letteratura e prospettive della ricerca sulle cellule staminali. *Ital Heart J Suppl*. 2004;5(1):1-13.

Dolan, N. C., Liu, K., Criqui, M. H., Greenland, P., Guralnik, J. M., Chan, C., Schneider, J. R., Mandapat, A. L., Martin, G. and McDermott, M. M. (2002) Peripheral artery disease, diabetes, and reduced lower extremity functioning. *Diabetes Care* 25, 113-120.

Dong L, Kang L, Ding L, Chen Q, Bai J, Gu R, Li L, Xu B. Insulin modulates ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization and neovascularization in diabetic mice. *Microvasc Res*. 2011 Nov;82(3):227-36. Epub 2011 Sep 21.

Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy B. Dual Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Angiogenesis in Type 1 Diabetic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:65-70.

Eckel, R. H., Alberti, K. G. M. M., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468), 1415-28.

Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., Roca, C., et al. (2012). Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 1-13.

Emanuelli C and Madeddu P (2002) Renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems coordinately modulate angiogenesis. *Hypertension* 39:e29.

Emanuelli C, Madeddu P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischemia. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 478–484.

Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pintus G, Kirchmayr R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. Targeting kinin B1 receptor for therapeutic angiogenesis. *Circulation*. 2002;105:360–366.

Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis *in vivo*. *Circulation*. 1999 Jun 15;99(23):3043-9.

Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, Agostini C, Avogaro A. Diabetes impairs progenitor cell mobilization after hindlimb ischemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006;49:3075–3084.

Fallahzadeh AR, Khazaei M, Sharifi MR. Restoration of angiogenesis by enalapril in diabetic hindlimb ischemic rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Jun;155(2):137-42.

Fang S, Wei J, Pentimikko N, Leinonen H, Salven P. Generation of functional blood vessels from a single c-kit⁺ adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol*. 2012;10(10):e1001407. doi: 10.1371/journal.pbio.1001407. Epub 2012 Oct 16.

Ferreira SH, Barteld DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 1970;9(13):2583–93.

Fleming I and Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1–R12, 2003.

Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18.

Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003 Nov.

Fowkes FG, Rudan D, Rudan I et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013; 382: 1329-40.

Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, Nedeau A, Thom SR, Velazquez OC. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 2007 May; 117(5):1249-59.

Gohlke P, Tschöpe C, Unger T. Bradykinin and cardiac protection. *Adv Exp Med Biol*. 1997;432:159-72.

Goldstein LB , Adams R , Alberts MJ , Appel LJ , Brass LM , Bushnell CD , Culebras A , Degraha TJ , Gorelick PB , Guyton JR , Hart RG , Howard G , Kelly-Hayes M , Nixon JV , Sacco RL , American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council , Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group , Cardiovascular Nursing Council , Clinical Cardiology Council , Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council , Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group , American Academy of Neurology Stroke. 04 May 2006, 37(6):1583-1633.

Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*. 2000.

Grochot-Przeczek, A.; Dulak, J.; Jozkowicz, A. Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease. *Gene*, v. 525, n. 2, p. 220–228, 2013.

Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Volund A, Markussen J, Kurtzhals P, The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin, *Pharm. Res*. 21 (2004) 1498-1504.

Hayashi I, Amano H, Yoshida S, Kamata K, Kamata M, Inukai M, Fujita T, Kumagai Y, Furudate S, Majima M. Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies. *Lab Invest*. 2002 Jul;82(7):871-80.

Hayashi MA, Camargo AC. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):1163-70. PMID: 15922781

Hayashi MA, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FC, Prezoto BC, Fernandes BL, Silveira PF, Silva CA, Pires RS, Britto LR, Dive V, Camargo AC. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J Neurochem*. 2003 May. *Cardiovasc Res*. 2008;80:106–113.

Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, et al. Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells. *Circulation* 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II301-8.

Heilmann C, Beyersdorf F, Lutter G. Collateral growth: cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 570–578.

Hiller KH, Ruile P, Kraus G, Bauer WR, Waller C. Tissue ACE inhibition improves microcirculation in remote myocardium after coronary stenosis: MR imaging study in rats. *Microvasc Res*. 2010 Dec;80(3):484-90. doi: 10.1016/j.mvr.2010.05.007. Epub 2010 Jun 4.

Hu DE, Fan TPD. [Leu8]des-Arg9-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin-1 in rats. *Br J Pharmacol*. 1993;109: 14–17.

Huang Y, Marui A, Sakaguchi H, Esaki J, Arai Y, Hirose K, et al. Sustained release of prostaglandin E1 potentiates the impaired therapeutic angiogenesis by basic fibroblast growth factor in diabetic murine hindlimb ischemia. *Circ J* 2008;72(10):1693e9.

Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stöcklin R, Martins de Camargo AC, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*. 2004 Jul;25(7):1085-92.

Ianzer D, Santos RA, Etelvino GM, Xavier CH, Santos JA, Mendes EP, Machado IT, Prezoto BC, Dive V, Camargo ACM. (2007) Do the cardiovascular effects of ace involve ace-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *bothrops jararaca*. *J pharmacol exp ther.*, 322:795-805.

Ianzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, Mendes EP, de Camargo AC, Santos RA. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2011 Dec;5(6):281-95. doi: 10.1177/1753944711427318. Epub 2011 Oct 27.

Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1231-6.

Isordia-Salas I, Sainz IM, Pixley RA, Martínez-Murillo C, Colman RW. High molecular weight kininogen in inflammation and angiogenesis: a review of its properties and therapeutic applications. *Rev Invest Clin.* 2005 Nov-Dec;57(6):802-13.

Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol.* 2002 Dec;29.

Jozkowicz, A.; Fugl, A.; Nanobashvili, J.; Neumayer, C.; Dulak, J.; Valentini, D.; Funovics, P.; Polterauer, P.; Redl, H.; Huk, I. Delivery of high dose VEGF plasmid using fibrin carrier does not influence its angiogenic potency. *The International Journal of Artificial Organs*, v. 26, n. 2, p. 161–169, 2003.

Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care* 2001; 24: 1433–1437.
Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care.* 2001; 24: 1433-7.

Jude EB. Intermittent claudication in the patient with diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2004; 4: 238–242.

Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Taniyama Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascular pharmacology* 2012 Aug 19;57(1):3-9.

Karamysheva A. F. , *Mechanisms of Angiogenesis*, Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe Shosse 24 (2007).

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res.* 2004 Aug 20; 95(4):354-63.

Lameu C, Pontieri V, Guerreiro JR, Oliveira EF, da Silva CA, Giglio JM, Melo RL, Campos RR, de Camargo AC, Ulrich H. Brain nitric oxide production by a proline-rich decapeptide from *Bothrops jararaca* venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2010 Dec;33(12):1283-8.

Lawall H, Bramlage P, Amann B: Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg.* 2011 Feb;53(2):445-53.

Lebrun I, Serrano SM, Camargo AC. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2009 Jul 24;284(30):20022-33.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*. 2005;57:27–77.

Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T. Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension* 2008;51:252-58.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995 Mar;47(1):25-49.

Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 92: 26–36.

Luyt CE, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collicec-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP, Osborne-Pellegrin M, Letourneur D, Michel JB. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:24-35.

Madeddu Pp, Eemanueli Cc, Sspillmann Ff, Mmeloni Mm, Bboubby Nn, Rricher Cc, Aalhenc-Ggelas Ff, Vvan Wweel Vv, Eeefting Dd, Qquax phPH, Hhu Yy, Xxu Qq, Hhemdahl Aal, Vvan Ggolde Jj, Hhuijberts Mm, Dde lussanet Qq, Bstruijker Bboudier Bh, Ccouuffinhal Tt, Dduplala Cc, Cchimenti Ss, Sstaszewsky Ll, Llatini Rr, Bbaumans Vv, L, Rajesh Katare, Mauro Siragusa,Marco Meloni, Ilaria Campesi, , Rajesh Katare, Mauro Siragusa,Marco Meloni, Ilaria Campesi, Manuela M EVY BI. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. *Vascular Pharmacology*. Nov;45(5):281-301. 2006.

Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, et al. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of B2 receptor gene. *Circulation*. 1997; 96: 3570–3578.

Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol*. 2005 May;90(3):315-26. Epub 2005 Mar 18.

Makdisse M, Pereira AC, Brasil DP, et al. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(6):370-82.

Marso SP, Hiatt WR. Peripheral arterial disease in patients with diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 921-9.

Maruyama K, Asai J, Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA Am. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *J Pathol.* 2007 Apr; 170(4):1178-91.

Mascarenhas JV, Albayati MA, Shearman CP, Jude EB. Peripheral arterial disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014; 43: 149-66.

Mejia AJ, Matus CE, Pavicic F, Concha M, Ehrenfeld P, Figueroa CD. Intracellular signaling pathways involved in the release of IL-4 and VEGF from human keratinocytes by activation of kinin B1 receptor: functional relevance to angiogenesis. *Arch Dermatol Res.* 2015 Nov;307(9):803-17. doi: 10.1007/s00403-015-1595-6. Epub 2015 Sep 4.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Clin Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S193–201.

Morais KL, Hayashi MA, Bruni FM, Lopes-Ferreira M, Camargo AC, Ulrich H, Lameu C. B₁-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B₂ and M₁ muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 2011 Mar 15;81(6):736-42.

Morbidelli, L., Chang, CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 2):H411-5.

Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999 Jun;33(6):1379-84.

Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Fernandes BL, Yamane T, and Camargo ACM (1997) Cloning and sequence of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1189–1193. 9037028.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-78.

Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274: C236-44.

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45 Suppl S:S5-67.

O'Hare AM, Katz R, Shlipak MG, Cushman M, Newman AB. Mortality and cardiovascular risk across the ankle-arm index spectrum: results from the Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2006 Jan 24;113(3):388-93.

Ondetti MA, Cushman DW. Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. *J Med Chem* 1981;24(4):355-61.

Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001;358:1257-64.

Parenti A., Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide pathway. *FASEB J* 2001; 15: 1487-9.

Pesquero, J.B. et al. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14, 8140-8145.

Phng, L. K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch. *Dev. Cell* 16, 196-208 (2009).

Prado LB. Avaliação dos efeitos dos peptídeos ricos em prolina do veneno da serpente *Bothrops jararaca* Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c na revascularização de membros posteriores isquêmicos. 109 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Abril/2013.

Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, Liu YH, Chan J, Tan C, Murthi P, Gargett C, Manuelpillai U. Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *PLoS One*. 2011; 6(11):e26136.

Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, Tschope C, Horwitz EM. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytherapy*. 2009; 11(4):427-34.

Prior BM, Lloyd PG, Ren J, Li Z, Yang HT, Laughlin MH, et al. Arteriogenesis: role of nitric oxide. *Endothelium J Endothel Cell Res* 2003; 10: 207-16.

Prompers, L., Schaper, N., Apelqvist, J., Edmonds, M., Jude, E., Mauricio, D., Uccioli, L., Urbancic, V., Bakker, K. and Holstein, P. (2008) Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. *Diabetologia* 51, 747-755.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677-684.

Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2002 Feb;13(1):61-7.

Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*. 1980; 32: 1–15.
Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671e4.

Riddle MC, Rosenstock J, Gerich J, The treat-to-target trial, randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients, *Diabetes Care* 26 (2003) 3080-3086.

Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol*. 1999;154: 355–363.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G., 1949. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156, 261–273.

Roguin, A.; Avivi, A.; Nitecki, S.; Rubinstein, I.; Levy, N. S.; Abassi, Z. a; Resnick, M. B.; Lache, O.; Melamed-Frank, M.; Joel, A.; Hoffman, A.; Nevo, E.; Levy, A. P. Restoration of blood flow by using continuous perimuscular infiltration of plasmid DNA encoding subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi* VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 8, p. 4644–8, 2003.

Sanchez de Miguel L1, Neysari S, Jakob S, Petrimpol M, Butz N, Banfi A, Zaugg CE, Humar R, Battagay EJ. B2-kinin receptor plays a key role in B1-, angiotensin converting enzyme inhibitor and vascular endothelial growth factor-stimulated in vitro angiogenesis in the hypoxic mouse heart. *Cardiovasc Res*. 2008 Oct 1;80(1):106-13. doi: 10.1093/cvr/cvn170. Epub 2008 Jun 19.

Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Sugaya T, Shimada T, Shintani S, Imaizumi T. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:603-11.

Schaper W, Troidl K. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2012.

Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, van de Kerkhof PC, de Waal RM, Ruiter DJ. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol*. 1991.

Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002;288:2579- 88.

Shigeta T, Morihiko Aoyama, Yasuko K Bando, Akio Monji, Toko Mitsui, Miwa Takatsu, Xiang-Wu Cheng, Takahiro Okumura, Akihiro Hirashiki, Kohzo Nagata, Toyooki Murohara. Dipeptidyl Peptidase-4 Modulates Left Ventricular Dysfunction in Chronic Heart Failure via Angiogenesis-Dependent and -Independent Actions. *Circulation*. 2012;126:1838-1851.

Silva CA, Portaro FCV, Fernandes BL, Ianzer DA, Guerreiro JR, Gomes CL, Konno K, Serrano SMT, Nascimento N, Camargo ACM. (2008) Tissue distribution in mice of bpp 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of bothrops jararaca. *Toxicon* 51:515-23.

Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001 Oct 12;89(8):678-83. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001;89: 678–683.

Silvestre JS, Levy BI. Molecular basis of angiopathy in diabetes mellitus. *Circ Res* 2006;98:4-6. Silvestre JS, Lévy BI. The renin-angiotensin system and post-ischemic angiogenesis. *Bull Acad Natl Med*. 2004;188(4):649-59; discussion 659.

Simons, M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111, 1556–1566 (2005).

Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol.* 2003 Jun;206(Pt 12):2083-7.

Song JS, Sainz IM, Cosenza SC, Isordia-Salas I, Bior A, Bradford HN, Guo YL, Pixley RA, Reddy EP, Colman RW. Inhibition of tumor angiogenesis *in vivo* by a monoclonal antibody targeted to domain 5 of high molecular weight kininogen. *Blood.* 2004;104:2065–2072.

Stone OA, Richer C, Emanuelli C, van Weel V, Quax PH, Katare R, Kraenkel N, Campagnolo P, Barcelos LS, Siragusa M, Sala-Newby GB, Baldessari D, Mione M, Vincent MP, Benest AV, Al Haj Zen A, Gonzalez J, Bates DO, Alhenc-Gelas F, Madeddu P. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):657-64.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Br Med J* 2000. 321(7258):405-412.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen DH, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* 199(5):434–438.

Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 2004;164(2):457–66.

Tateno K, Minamino T, Tokoetal H. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 2006; 98: 1194–1202.

Tavintharan S, Ning C, Su Chi L et al. Prevalence and risk factors for peripheral artery disease in na Asian population with diabetes mellitus. *Diabetes & vascular disease research.* 2009; 6: 80-6.

Taylor, S. I. (1999). Deconstructing Type 2 Diabetes Minireview. *Cell*, 97(April), 9-12.

Troidl K, Tribulova S, et al. Effects of endogenous NO and of DETA NONOate in Arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55(2): 153–160.

Tsai AW, Folsom AR, Rosamond WD, Jones DW. Ankle-brachial index and 7-year ischemic stroke incidence: the ARIC study. *Stroke*. 2001; 32: 1721-4.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343–354. [PubMed: 15321944].

Vajanto, I.; Rissanen, T. T.; Rutanen, J.; Hiltunen, M. O.; Tuomisto, T. T.; Arve, K.; Närvänen, O.; Manninen, H.; Räsänen, H.; Hippeläinen, M.; Alhava, E.; ylä-herttua, S. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *The journal of Gene Medicine*, v. 4, n. 4, p. 371–380, 2002.

Van Golde JM, Ruiter MS, Schaper NC, Vöö S, Waltenberger J, Backes WH, Post MJ, Huijberts MS. Impaired collateral recruitment and outward remodeling in experimental diabetes. *Diabetes*. 2008 Oct;57(10):2818-23. doi: 10.2337/db08-0229.

Weir MR. Effects of renin-angiotensin system inhibition on endorgan protection: can we do better? *Clin Ther*. 2007 Sep;29(9):1803-24.

Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-70.

World Health Organization – WHO – Global report in Diabetes. ISBN 978 92 4 156525 7.

Wu, K. K., & Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis*, 191(2), 241-9.

Yan J, Guodong Tie, Brian Park,¹ Yagai Yang,² Philip T. Nowicki,¹ and Louis M. Messina. Recovery from hindlimb ischemia is less effective in type 2 than in type 1 diabetic mice: Roles of eNOS and endothelial progenitor cells. *J Vasc Surg*. 2009 Dec; 50(6): 1412–1422.

Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2278-91. doi: 10.1021/pr901027r.

Zhi K, Gao Z, Bai J, Wu Y, Zhou S, Li M, Qu L. Application of adipose-derived stem cells in critical limb ischemia. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jan 1; 19():768-76.

