

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANGIOGÊNESE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA XANTINA OXIDASE
(ALOPURINOL) NO MODELO MURINO DE ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA**

ALUNA: Laura Alejandra Ariza Orellano

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade

BELO HORIZONTE

2015

LAURA ALEJANDRA ARIZA ORELLANO

**Avaliação Do Efeito Do Inibidor Da Enzima Xantina Oxidase (Alopurinol) No
Modelo Murino De Angiogênese Inflamatória**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BELO HORIZONTE/MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitoria de Pós Graduação

Pró-Reitor: Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor Adjunto: Humberto Osório Stumpf

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ ICB/ UFMG

Diretora: Andrea Mara Macedo

Vice-Diretor: Carlos Augusto Rosa

Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Coordenador: Christopher Kushmerick

Trabalho realizado no Laboratório de Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Federal de Minas Gerais.

“Qualquer um que está seriamente comprometido com a busca da ciência, chega a se convencer que em todas as leis do universo está manifesto um espírito muito superior ao homem, e que com as nossas habilidades devemos nos sentir humildes.” (Albert Einstein)

A Deus, à minha família e aos meus amigos pelas oportunidades, pelo apoio e
pela ajuda que me brindaram sempre.

AGRADECIMENTOS

Com enorme gratidão a Deus e, a minha família!

Muitíssimo obrigada por todo o apoio, carinho e bons conselhos prestados por meus amigos: Simone Almeida, Fernanda da Silva, Pollyana Castro, Suzane Marques, Jouse Pereira e Celso Tarso. Obrigada também as professoras: Paula Peixoto, Mônica Ferreira, Luzia Modolo e, especialmente a minha orientadora a Dra. Silvia Passos Andrade que me ensinaram, orientaram e ajudaram a desenvolver este trabalho. E a equipe dos laboratórios de Angiogênese e Fisiologia Vegetal que de uma ou outra maneira participaram dos experimentos que culminaram no cumprimento desta meta.

De coração OBRIGADA!

LISTA DE ABREVIATURAS

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
iNOS	Oxído Nítrico Sintase Induzível
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NO	Óxido Nítrico
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SEM	Erro Padrão da Média
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine
TGF-β1	Fator de crescimento transformante β1
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular
XO	Xantina Oxidase
XRO	Xantina Oxido Redutase

As demais abreviaturas e siglas foram explicadas quando citadas pela primeira vez no texto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Interação entre inflamação aguda e crônica e angiogênese.</i>	14
Figura 2- <i>Angiogênese durante a inflamação.</i>	16
Figura 3- <i>Biosíntese do ácido úrico.</i>	22
Figura 4- <i>Efeito do alopurinol sobre a XO.</i>	26
Figura 5- <i>Esquema do implante de matriz sintética.</i>	30
Figura 6- <i>Medição direta de NO e H₂O₂ através de macroeletrodo sensível...</i>	39
Figura 7- <i>Efeitos do tratamento com alopurinol sobre os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzido por uma matriz sintética.</i>	45
Figura 8- <i>Imagens in situ de implantes de 7 e 14 dias.</i>	47
Figura 9- <i>Efeitos do tratamento com alopurinol sobre os componentes angiogênicos do tecido fibrovascular induzido pelo implante de uma matriz sintética.</i>	48
Figura 10- <i>Cortes histológicos representativos de implantes de matriz sintética corados com Hematoxilina e Eosina (HE), mostrando o padrão de infiltração de tecido fibrovascular..</i>	49
Figura 11- <i>Efeitos do tratamento com alopurinol na geração de NO e H₂O₂ no tecido fibrovascular induzido por uma matriz sintética em camundongos.</i>	51
Figura 12- <i>Efeitos do tratamento com alopurinol no componente fibrogênico do tecido fibrovascular induzido por matriz sintética (poliéter-poliuretano).</i>	52
Figura 13- <i>Difusão da Fluorescência (avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo) nos animais com implantes de sete dias.</i>	53

Índice

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO	5
3.1. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS.....	6
3.2. MODELO DE IMPLANTE DE MATRIZ SINTÉTICA PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA.....	7
3.3. INFLAMAÇÃO	9
3.3.1. <i>Etapas da Inflamação</i>	10
3.4. ANGIOGÊNESE	15
3.4.1. <i>Etapas da angiogênese</i>	15
3.4.2. <i>Mediadores da angiogênese</i>	16
3.4.3. <i>Inflamação & Angiogênese</i>	20
3.5. FIBROGÊNESE.....	21
3.6. XANTINA OXIDASE	22
3.7. ALOPURINOL E OS SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS.....	25
4. JUSTIFICATIVA.....	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. OBJETIVO GERAL	28
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
6.1. ANIMAIS UTILIZADOS	29
6.2. IMPLANTES DE MATRIZ SINTÉTICA	29
6.2.1. <i>Obtenção dos discos de matriz sintética</i>	29
6.2.2. <i>Implantação das matrizes sintéticas</i>	29
6.2.3. <i>Retirada do implante de matriz sintética</i>	31
6.3. PREPARO DAS SOLUCÕES DE ALOPURINOL.....	31
6.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	31
6.5. ANÁLISE DE PARÂMETROS DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS INTRAIMPLANTE.....	34
6.5.1. <i>Dosagem de hemoglobina</i>	34
6.5.2. <i>Quantificação das citocinas VEGF, CCL-2, TNF-α e TGF-β1</i>	35
6.6. ANÁLISE DE DENSIDADE VASCULAR.....	35
6.6.1. <i>Avaliação histológica</i>	35
6.7. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	36
6.7.1. <i>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	36

6.7.2.	<i>Avaliação da atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....</i>	37
6.8.	MEDIÇÃO DIRETA DE NO E H ₂ O ₂	37
6.8.1.	<i>Mensuração direta dos níveis de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	37
6.8.2.	<i>Quantificação de colágeno.....</i>	39
6.9.	AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO CUTÂNEO	40
6.9.1.	<i>Técnica de difusão da fluoresceína.</i>	40
6.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
7.	RESULTADOS.....	42
7.1.	CURVA DOSE-RESPOSTA –ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA AGUDA VS CRÔNICA	42
7.1.1.	<i>PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS:.....</i>	42
7.1.2.	<i>PARÂMETROS DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS INTRAIMPLANTE.....</i>	46
7.1.3.	<i>MEDIÇÃO DIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO E PERÓXIDO DE HIDRÓGENIO</i>	49
7.1.4.	<i>PARÂMETROS FIBROGÊNICOS</i>	51
7.1.5.	<i>FLUXO SANGUÍNEO CUTÂNEO</i>	52
8.	DISCUSSÃO	54
9.	CONCLUSÃO.....	63
10.	REFERÊNCIAS.....	64

1. RESUMO

Inibidores da xantina oxidase, reguladores da formação de superóxido (O_2^-), têm sido utilizados para o tratamento de várias formas de isquemia e lesões vasculares, além da sua indicação terapêutica clássica em hiperurecemia e gota. Neste estudo, avaliamos os efeitos do alopurinol na angiogênese inflamatória induzida pelo implante subcutâneo de uma matriz sintética (poliéter-poliuretano) em camundongos (C57/BL6 – 6-7 semanas). Três grupos de animais ($n=8 - 15$ que receberam por via oral diferentes doses de alopurinol (0,01, 0,1, ou 1,0 mg/kg, respectivamente) começando o tratamento 24 h após implantação, durante a resposta aguda da formação do tecido fibrovascular. Um grupo de animais ($n=9$) recebeu alopurinol (1,0 mg/kg) na fase crônica do processo (8 dias pós-implante). O alopurinol reduziu de forma dose dependente o conteúdo de hemoglobina, os níveis da citocina VEGF e o número de vasos sanguíneos (parâmetros angiogênicos) nos implantes. Similarmente, houve inibição dos parâmetros inflamatórios (atividade de mieloperoxidase –MPO e n-acetil- β -D-glucosaminidase –NAG e os níveis das citocinas, Fator de Necrose Tumoral α – TNF- α e CCL2) após tratamento com o composto. A produção de NO e H_2O_2 também foi reduzida de forma dose dependente pelo inibidor quando administrado na fase aguda do processo inflamatório, no entanto todos os parâmetros avaliados apresentaram efeito oposto (aumento) quando o alopurinol foi administrado na fase crônica da formação do tecido fibrovascular.

Nos parâmetros fibrogênicos, foram observados efeitos antagônicos (Pró e Anti-fibrogênico) dependendo da fase do início do tratamento. Em conclusão, os efeitos inibitórios ou estimuladores do alopurinol sobre os componentes

angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido fibrovascular foram dependentes da fase do início do tratamento. Estes achados ampliam o potencial terapêutico do fármaco no controle de doenças fibroproliferativas e no tratamento co-adjuvante na cicatrização de lesões.

Palavras chaves: Alopurinol, Xantina Oxidase, Implante de Matriz Sintética, Angiogênese, Inflamação, Fibrogênese, Óxido Nítrico, Peróxido de Hidrogênio.

2. ABSTRACT

Xanthine oxidase inhibitors, key regulators of reactive oxygen species, have been used in the treatment of various ischemic conditions and vascular lesions, besides their classical use in hyperurecemia and gout. Here, we have evaluated the effects of allopurinol on inflammatory angiogenesis induced by subcutaneous implantation of polyether-polyurethane matrix in C57/BL6 mice. Groups of animals (n=8 - 15) that received oral administration of allopurinol (0.01, 0.1 or 1.0 mg/kg) were treated 24h after implantation, during the acute formation of the fibrovascular tissue. Another group of animals (n= 9) were treated with allopurinol (1.0 mg/kg) 8 days after implantation for 6 consecutive days (chronic phase). Angiogenesis, was determined by hemoglobin content, VEGF levels and number of vessels intraimplant, inflammation (myeloperoxidase –MPO, n-acetyl- β -D-glucosaminidase –NAG, TNF- α and CCL2 levels) were reduced by allopurinol. Similarly, the treatment inhibited nitric oxide and H₂O₂ production. However, fibrogenesis determined by collagen deposition and levels of TGF- β 1 increased in the implants after allopurinol treatment. In marked contrast with the effects of the treatment initiated on the acute phase of the process, allopurinol increased angiogenesis, inflammation, NO, and H₂O₂ production but reduced collagen and TGF- β 1 levels intraimplant when the treatment was started during the chronic inflammatory process. The dual effects of allopurinol described here, extend its range of actions as a potential agent able to modulate the components of the fibrovascular tissue present in both physiological (healing processes) as well as in chronic fibroproliferative diseases. This modulatory effects depends of the

phase at which is treatment is initiated that in turn is dependent on the generation of ROS.

Keywords: Allopurinol, Xanthine Oxidase, Sponge Implant Model, Angiogenesis, Inflammation, Fibrogenesis, Nitric Oxide, Hydrogen Peroxide.

3. INTRODUÇÃO

Um desafio fundamental na prática clínica atual, é a inovação farmacêutica e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças existentes, mas a pesquisa, o desenvolvimento e produção de novos fármacos constituem um processo complexo, lento e dispendioso. Sendo assim e em resposta às necessidades atuais surgiu o conceito de “Drug Repositioning” ou Reposicionamento de Fármacos, o qual consiste na utilização de fármacos já comercializados primariamente para o tratamento de um tipo de patologias em outras doenças (Abu-Soud and Hazen, 2000; Albini et al., 2005; Aldaba-Muruato et al., 2013; Alimonda et al., 2009; Almeida et al., 2014; Andrade et al., 1987; Andrade and Ferreira, 2009; Andrade et al., 1997; Araujo et al., 2011; Araujo et al., 2010; Arenberg et al., 1997a; Arenberg et al., 1997b; Ashburn and Thor, 2004; McManaman et al., 1999) reduzindo assim os custos em pesquisa e o risco de desencadear efeitos indesejáveis e/ou deletérios que só serão conhecidos com o tempo de uso. À luz deste conceito o Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG tem utilizado o modelo de implante de matriz sintética de poliéter-poliuretano em testes pré-clínicos de fármacos com potencial terapêutico na angiogênese inflamatória.

Uma variedade de compostos dentre eles, a talidomida, rosiglitazona, clotrimazol, atorvastatina, simvastatina, metformina e dipiridamol (Araujo et al., 2011; Araujo et al., 2010; de Souza et al., 2014; Sampaio et al., 2012; Xavier et al., 2010) utilizados clinicamente no tratamento de várias condições patológicas apresentaram capacidade de modular os componentes inflamatório, angiogênico

e fibrogênico, do tecido fibrovascular recém formado induzido pelo implante de matriz sintética. Na última década o alopurinol, um fármaco comumente utilizado para tratamento da gota e hiperuricemia primária e secundária, têm mostrado efeitos benéficos no tratamento de tecidos isquêmicos e outras lesões vasculares como a úlcera venosa (Fernandez et al., 2012; Fernandez et al., 2014; Grisham et al., 1986; Manning et al., 1984). Considerando os efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes deste composto em outros sistemas, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do alopurinol na angiogênese inflamatória induzida pelo implante de matrizes sintéticas alojadas no espaço subcutâneo do dorso de camundongos.

3.1. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O reposicionamento de fármacos tem vindo a ganhar importância nos últimos anos como a necessidade crescente de desenvolvimento de medicamentos e novas terapias, ainda mais levando em conta que as melhoras na produção e desenvolvimento de empresas farmacêuticas não tem gerado os resultados esperados (Aronson, 2007; Ashburn and Thor, 2004). Usando o reposicionamento de fármacos, as empresas farmacêuticas têm alcançado um número de sucessos, como por exemplo Viagra de Pfizer na disfunção erétil e talidomida do Celgene no eritema nodoso hansênico severo (Gupta et al., 2013).

Uma vantagem significativa desta prática comparada com desenvolvimento tradicional de fármacos é que o composto a ser reposicionado já tem sido aprovado num número significativo de testes de toxicidade, dose farmacológica, efeitos indesejáveis de entre outros, que conferem-lhe uma margem de

segurança conhecida e diminui o risco de fracasso por causa da toxicidade e reações adversas forem reduzidas. Mais do 90% de fármacos falham durante o processo de desenvolvimento (Ashburn and Thor, 2004).

Como já mencionado nossa equipe de pesquisa tem realizado uma variedade de testes com diferentes fármacos (Araujo et al., 2011; Araujo et al., 2010; de Souza et al., 2014; Sampaio et al., 2012; Xavier et al., 2010) contribuindo assim ao reposicionamento dos mesmos, um notável exemplo destes é a talidomida, a qual foi inicialmente comercializada como sedativo e hipnótico prescrito como tendo utilidade na ansiedade, insônia, gastrite e tensão e que era seguro e inofensivo para as mulheres grávidas (Kida and Lenz, 1968; Lenz, 1966), além de útil para combater os enjoos matinais próprios do primeiro trimestre de gravidez. E após a comprovação dos seus efeitos teratogênicos e mediante pesquisas e testes exaustivos foi mostrada a sua utilidade em doenças como lúpus, diminuição na rejeição de transplantes de medula, entre outras (Matthews and McCoy, 2003; Peuckmann et al., 2003; Vianna et al., 2013), em testes realizados pela nossa equipe de pesquisa corroboraram um efeito modulador do composto sobre a angiogênese inflamatória (Belo et al., 2001; de Souza et al., 2014). Tem sido por meio do uso do modelo de implante de matriz sintética que novas ações de vários compostos têm sido propostas.

3.2. MODELO DE IMPLANTE DE MATRIZ SINTÉTICA PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA

Este modelo consiste em que matrizes sintéticas inicialmente acelulares e não vascularizadas são implantadas no tecido subcutâneo do animal induzindo a

formação de um tecido fibrovascular semelhante àquele formado durante o reparo tecidual. As matrizes sintéticas de poliéter-poliuretano estimulam um processo complexo dirigido inicialmente por células inflamatórias que se acumulam dentro do compartimento da matriz sintética e posteriormente por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria. Este modelo também proporciona um ambiente inflamado em que cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (recrutamento e ativação de células inflamatórias, angiogênese e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado (Andrade et al., 1987; Belo et al., 2004; Bradshaw et al., 2001; Campos et al., 2006).

Dessa forma, variáveis bioquímicas do tecido fibrovascular, incluindo metabolismo de colágeno, deposição de fibronectina e turnover de proteoglicanos podem ser quantificados. Além disso, a técnica é empregada para caracterizar a sequência de alterações histológicas na formação do tecido de granulação e para monitorar a cinética de proliferação celular. A determinação do acúmulo de neutrófilos e macrófagos no compartimento da matriz sintética de poliéter-poliuretano tem sido possível pela quantificação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-D- β -glicosaminidase (NAG), respectivamente. O modelo de inflamação aguda é particularmente útil, permitindo a coleção e análise das fases fluidas e celulares do exsudado formado dentro da matriz sintética (Andrade and Ferreira, 2009).

O tecido fibrovascular proliferativo induzido pelo implante é similar ao tecido que forma o substrato para um número de doenças tais como: Cirrose Hepática,

Pancreatite Crônica e Fibrose Pulmonar (Andrade et al., 1987; Oviedo-Socarras et al., 2014).

Esse tecido é formado por diferentes componentes:

- Inflamação
- Angiogênese
- Fibrogênese

3.3. INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é um processo complexo que requer fatores e tipos celulares distintos tais como: neutrófilos, mastócitos, macrófagos, fibroblastos e, células endoteliais os quais, de forma coordenada, controlam o dano tecidual contra injúria por agentes patogênicos, traumáticos ou tóxicos. A inflamação é a primeira e a mais importante reação do dano celular e tecidual (Albini et al., 2005). O processo inflamatório é altamente coordenado por moléculas pró- e anti-inflamatórias que regulam a quimiotaxia, migração e proliferação celular (Murphy et al., 2011; Nunes et al., 2011; Thuraisingam et al., 2010; Wright et al., 2010). A inflamação, geralmente, termina com um processo de reparo. No entanto, se esse processo de reparo não é corretamente ordenado, resulta em uma inflamação crônica. A inflamação que evolui para a cura e a inflamação persistente apresentam etapas ou momentos semelhantes como: irritação, alterações vasculares, exsudação plasmática e celular, lesões degenerativas e necróticas, proliferação de tecido conjuntivo e vascular, e modificações das células do exsudado. Tais fenômenos inflamatórios não são isolados no tempo. Embora tenham seu início em momentos sucessivos, muitas vezes eles se

superpõem durante o desenrolar do processo (Benelli et al., 2006; Charo and Ransohoff, 2006; Charo and Taubman, 2004).

3.3.1. Etapas da Inflamação

Os estímulos que desencadeiam a inflamação são de vários tipos: infecções e toxinas microbianas; Trauma (contuso ou penetrante); agentes físicos e químicos (lesão térmica, queimaduras ou congelamento; radiação; entre outras) necrose tissular; corpos estranhos; reações imunológicas (também chamadas de reações de hipersensibilidade).

Apesar das diferentes etiologias, o mecanismo de ação da inflamação é sempre o mesmo. O agente inflamatório age sobre os tecidos induzindo a liberação de mediadores químicos vasoativos (citocinas, histamina, proteases e icosanoídes) (Coussens and Werb, 2002). Estes mediadores ficam armazenados em células como os mastócitos ou são produzidos por outras células, tais como: células endoteliais, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células parenquimatosas ou do estroma. No plasma os mediadores liberados atuam promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade, que leva ao extravasamento de líquido plasmático; recrutamento, migração e adesão de células inflamatórias (Nathan, 2002; Pereira et al., 2006).

A inflamação aguda possui três fases principais: (1) alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo; (2) alterações estruturais na microcirculação, que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; e (3) emigração dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco da lesão e sua ativação para eliminar o agente nocivo.

1. Alteração vascular e do fluxo: A vasodilatação leva a um aumento do fluxo no local da lesão, estes são os primeiros sinais evidentes no foco inflamatório, no intuito de aumentar, deste modo, a demanda de células inflamatórias. Esta fase é guiada, praticamente, pela liberação de histamina e serotonina. 2. Aumento da permeabilidade vascular: a dilatação do vaso gera um aumento na permeabilidade vascular daquela região acometida pelo processo inflamatório. Levando conseqüentemente, ao extravasamento de líquido rico em proteínas principalmente, proteínas do complemento (C3a e C5a –Induzem aos mastócitos a liberar histamina) para o espaço intersticial (exsudato). A perda de líquido intravascular produz hemoconcentração local, ficando assim, um sangue mais viscoso e lento (estase). Quando a estase se desenvolve, ocorre uma orientação periférica de leucócitos, levando a seguinte fase 3. Exsudação leucocitária: processo pelo qual os leucócitos (mais especificamente, nesta fase inicial, o polimorfonuclear; neutrófilo) realizam a marginação, rolamento, adesão e diapedese (migração) para alcançar o tecido inflamado (Charo and Ransohoff, 2006; Charo and Taubman, 2004; de Oliveira et al., 2007). Toda esta fase é guiada pela ação das selectinas, integrinas e fatores quimiotáticos.

Uma das funções essenciais da inflamação é o direcionamento de leucócitos à área lesada e a sua ativação em função da defesa do hospedeiro. A exsudação leucocitária inicia no lúmen, onde por meio da emissão de moléculas sinalizadoras pelas células endoteliais, os polimorfonucleares passam pelas seguintes etapas: marginação, rolamento (processo induzido pelas selectinas, que garantem uma maior eficácia neste processo) e adesão ao endotélio

(mediado pelas integrinas), sendo este o passo inicial para que depois eles saiam dos vasos; etapa conhecida como transmigração (diapedese) através do endotélio; e finalmente a migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático.

Durante a inflamação, as primeiras células a deixarem os vasos são os polimorfonucleares, os leucócitos migram nos tecidos em direção ao local da lesão por um processo chamado de quimiotaxia. Eles constituem as células predominantes do exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Uma série de agentes quimiotáticos endógenos como: componentes do sistema complemento, especialmente o C5a e C3a; produtos da via da lipoxigenase, especialmente o leucotrieno B₄ (LTB₄); e citocinas, especialmente as que pertencem à família das quimiocinas (como o IL-8, por exemplo) e exógenos, produtos bacterianos (como os peptídeos que possuem o N-formil-metionina terminal). Todos os agentes quimiotáticos mencionados se unem a receptores específicos ligados à proteína G (GPCRs) (Charo and Ransohoff, 2006; Charo and Taubman, 2004). Os sinais iniciados por esses receptores resultam no recrutamento das proteínas G e na ativação de várias moléculas efetoras, incluindo a fosfolipase C (PLC γ) e a fosfoinositol-3 cinase (PI3K). A PLC γ e a PI3K atuam no fosfolípido inositol da membrana e geram mensageiros lipídicos secundários que aumentam o cálcio citosólico e ativam pequenas GTPases (da família Rac/Rho/cdc42), responsáveis, entre outras funções, por induzir a polimerização da atina do citoesqueleto celular. Desta maneira, os leucócitos são capazes de se locomover estendendo pseudópodes até o foco inflamatório. Em seguida, monócitos migram para o sítio inflamatório por quimiotaxia, onde se

diferenciam em células dendríticas e macrófagos. Os monócitos começam a migrar dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a diapedese, estes se acumulam rapidamente e então, os macrófagos passam a ser as células predominantes após 24 horas (de Oliveira et al., 2007; Kumar et al., 2008).

Os macrófagos irão produzir uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas em vários tipos celulares incluindo células endoteliais (ECs), células epiteliais e células de origem mesenquimal (Visser et al., 2006). Os macrófagos liberam substâncias biologicamente ativas tais como: Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), proteases, citocinas, quimiocinas, fatores de coagulação e metabólitos do ácido araquidônico (responsáveis pelo recrutamento de leucócitos) além de fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), citocinas fibrogênicas e fatores estimulantes da angiogênese (Kumar et al., 2008) que contribuem na remodelação tecidual e o recrutamento de leucócitos do tipo linfócito B e T citotóxicos (Visser et al., 2006).

A resposta inflamatória é contrabalançada pelo equilíbrio entre os fatores pró e anti-inflamatórios que co-existem no local da lesão. A mudança de uma potente inflamação para um processo de reparo é um ponto crítico promovido por vários sinais antiinflamatórios que atuam ativamente para terminar a reação (como as prostaglandinas E1 e E3 –PGE1 e PGE3 –e lipoxinas antiinflamatórias), os quais são redundantes, rápidos e reversíveis (Tracey, 2002). Sempre que a taxa de

fatores pró-inflamatórios supere a quantidade de fatores antiinflamtórios, a reação inflamatória torna-se persistente e aberrante. A ruptura deste equilíbrio leva a um aumento da produção de proteases, proteoglicanos, mediadores lipídicos e prostaglandinas pró-inflamatórias (PGE2) que, concomitantemente, exacerbam o processo (Mrowietz and Boehncke, 2006). Na inflamação um papel importante é conferido ao endotélio. De fato, o local inflamado se caracteriza pelo aumento do infiltrado celular e o processo angiogênico, sendo assim, a inflamação e a angiogênese podem agir simultânea e sinergicamente (Figura 1) para a manutenção de uma variedade de condições tanto fisiológicas, quanto patológicas como a artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose, diabetes, doença de Crohn's e câncer (Granger and Senchenkova, 2010; Savvatis et al., 2010).

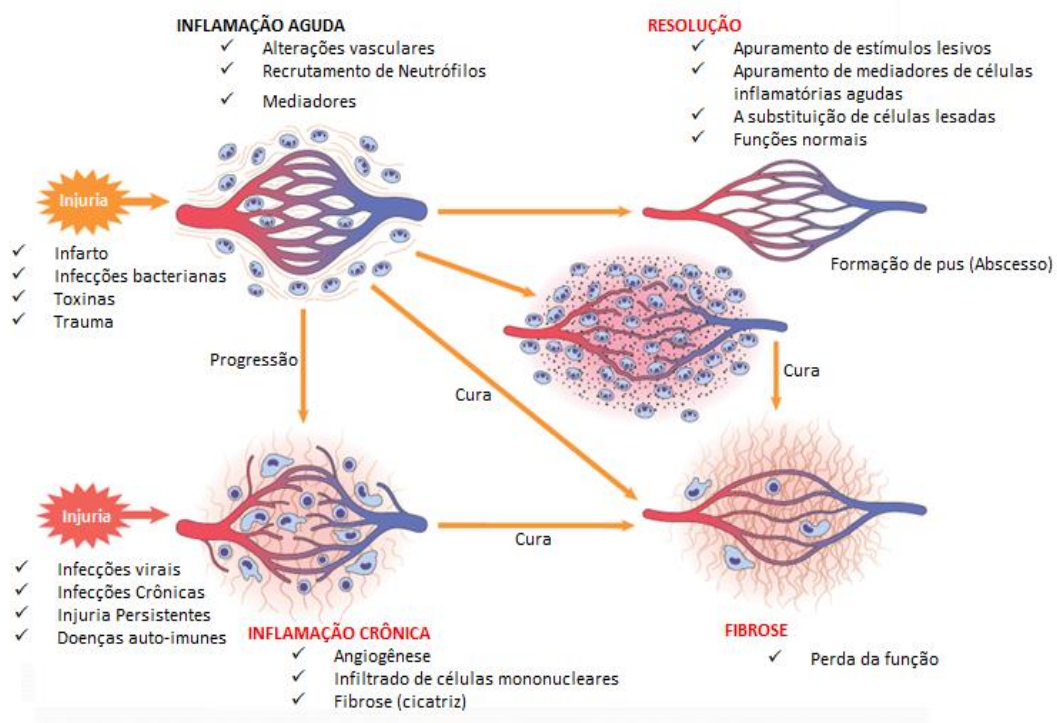


Figura 1- Interação entre inflamação aguda e crônica e angiogênese. “Resultados de inflamação aguda: resolução, cura por fibrose ou inflamação crônica”. Modificado de <http://www.studyblue.com/notes/note/n/5-chronic-inflammation-patterns-and-systemic-effe>

3.4. ANGIOGÊNESE

Em indivíduos adultos, em condições normais, as células endoteliais permanecem em estado de quiescência (Arenberg et al., 1997a). Este estado está associado a um equilíbrio entre fatores endógenos pró e anti-angiogênicos. No entanto, esse equilíbrio pode ser rompido por fatores químicos ou físicos como, por exemplo, injúria tissular, hipóxia, alteração na liberação de citocinas, fatores de crescimento endoteliais (Folkman and Greenspan, 1975; Otrrock et al., 2007) e alterações do fluxo sanguíneo e do formato celular, desencadeando a ativação de células endoteliais (Mignatti and Rifkin, 1996; Moses, 1997; Murphy et al., 1999). Em decorrência da estimulação ocorre uma sequência de eventos –Proliferação, migração, produção de fatores angiogênicos– (Folkman and Klagsbrun, 1987; Greenhalgh, 1996) culminando na neoformação vascular (angiogênese). O inadequado crescimento ou manutenção dos vasos pode levar ao aparecimento de doenças isquêmicas como infarto do miocárdio, patologias neurodegenerativas ou desordens associadas à obesidade; enquanto que o crescimento vascular excessivo ou o remodelamento anormal da rede vascular podem contribuir para a exacerbação e persistência de várias condições patológicas como o câncer, doenças oftalmológicas e processos inflamatórios crônicos (Slevin et al., 2009).

3.4.1. Etapas da angiogênese

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação associada a um aumento da permeabilidade capilar, levando ao acúmulo de componentes do plasma no compartimento intersticial. Após a desestabilização da monocamada de células endoteliais, as células migram em direção ao estímulo angiogênico (haptotaxia)

dentro do espaço extravascular. A migração e proliferação das células endoteliais levam a formação de cordões endoteliais nos tecidos-alvo que mais tarde canalizam-se para formar vasos funcionais. Posteriormente há a migração de células periendothelias que conferem estabilidade aos vasos (Granger and Senchenkova, 2010). A figura 2 ilustra as etapas da formação vascular que ocorre durante os processos inflamatórios.

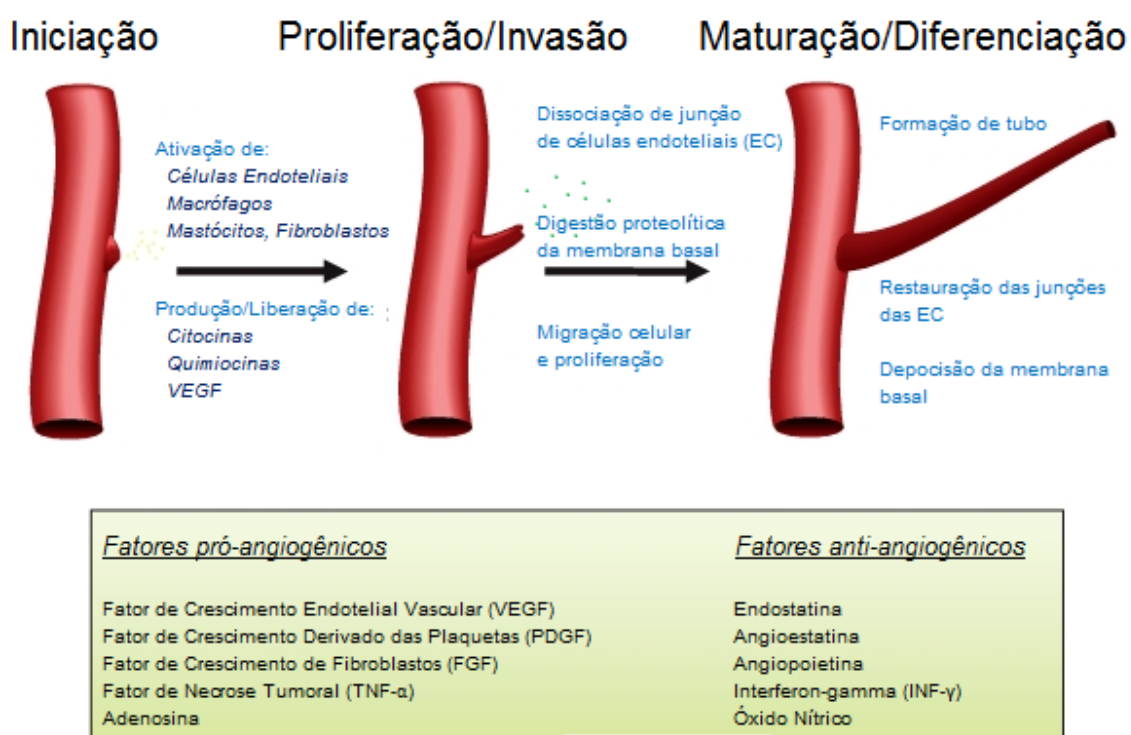


Figura 2- Angiogênese durante a inflamação. “Durante a inflamação, a angiogênese é iniciada pela ativação de diferentes populações de células, que liberam uma grande variedade de fatores angiogênicos. A fase seguinte (proliferação/invasão) envolve mudanças na parede do vaso, que permite a migração e proliferação das células endoteliais. A fase final (maturação/diferenciação) inclui a formação do tubo e restauração da parede do vaso. A taxa de angiogênese é determinada pelo equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos”. Modificado de GRANGER & SENCHENKOVA 2010.

3.4.2. Mediadores da angiogênese

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle com fatores angiogênicos e anti-angiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância

dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorreria quando esta relação for inversa. Como exemplo de fatores angiostáticos temos os pericitos, vários componentes da matriz extracelular como endostatina (O'Reilly et al., 1997) e tumstatina (Maeshima et al., 2000), fragmentos de colágeno tipo XVIII (matriz extracelular –MEC) e IV (membrana basal) e a trombospondina os fatores pro-angiogênicos mais estudados são: a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF- α), quimiocinas, angiogenina, células inflamatórias (Bernardini et al., 2003; D'Amore and Thompson, 1987).

A família VEGF e seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) têm sido reconhecidos como tendo um papel central na regulação da angiogênese. O VEGF-A estimula diretamente a proliferação de CEs ligando-se ao VEGFR-2 para ativar a tirosinaquinase e iniciar o surgimento de novos vasos a partir de microvasos existentes (Dvorak, 2005; Hicklin and Ellis, 2005). O VEGF parece mediar vários passos no processo de formação do broto e também diminui a junção célula-célula endotelial do broto angiogênico, promovendo a fosforilação e internalização da VE caderina. Enquanto que a maioria dos efeitos angiogênicos do VEGF são mediados através do VEGFR-2, a hiperpermeabilidade associada a este processo requer a ativação de VEGFR-1 e VEGFR-2. Finalmente, o VEGF pode também contribuir para o processo angiogênico pela mobilização de células progenitoras endoteliais e outras células mielóides ao sítio da angiogênese (Arenberg et al., 1997b; Chang and Werb, 2001; Granger and Senchenkova, 2010; Hicklin and Ellis, 2005).

As células inflamatórias residentes e do infiltrado, ECs, e células do músculo liso do vaso têm a capacidade de gerar grandes quantidades de citocinas e quimiocinas. Algumas destas substâncias exercem propriedades pró-angiogênicas ou anti-angiogênicas significativas que podem influenciar a intensidade da resposta angiogênica induzida durante a inflamação. Alguns dos efeitos sobre a angiogênese, que são atribuídos às citocinas relacionadas com a sua capacidade de preparar as CEs, para as ações subseqüentes de VEGF (Granger and Senchenkova, 2010). O fator de necrose tumoral (TNF) é representado por dois polipeptídios homólogos derivados de fagócitos mononucleares e linfócitos (TNF- α e TNF- β). O TNF também é produzido e secretado por neutrófilos, células NK (natural killer), células endoteliais, mastócitos e algumas células tumorais (Borish and Steinke, 2003; Sherry and Cerami, 1988).

Os TNF- α e β exercem suas atividades biológicas através de ligação a dois distintos receptores na membrana celular – TNFR1 (55-60 kDa) e TNFR2 (70-80 kDa) – com afinidades similares, produzindo efeitos semelhantes (Grell et al., 1995; Tartaglia and Goeddel, 1992) e ativando várias vias de sinalização (Gupta, 2002). O TNF- α sinaliza também pela ativação de NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B) –(Gupta, 2002).

O TNF é um dos principais mediadores das reações inflamatórias, sendo um potente ativador de neutrófilos, mediando à aderência, quimiotaxia e a degranulação. Além de induzir permeabilidade vascular, tem efeito inotrópico negativo e, é um importante mediador do choque séptico (Borish and Steinke,

2003; Sedgwick et al., 2002). O TNF induz a produção de autacóides em células endoteliais, incluindo prostanóides (particularmente PGI₂), fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico (NO) –(Mantovani et al., 1997).

A angiogênese envolve a ativação de um número importante de vias de sinalização. Enquanto o VEGF e citocinas/quimiocinas pode estimular diferentes componentes desse processo por meio de diferentes vias de sinalização, o balanço entre a produção de ROS parece ser um importante modulador da resposta angiogênica a inflamação. VEGF e várias citocinas são conhecidas pelo seu efeito de activar a NADPH-oxidase, em CEs vasculares. Há também evidências de que VEGF provoca a ativação da eNOS, via PI3K/dependente da Akt. As ROS dependente da NADPH oxidase e eNOS dependente desta sinalização parecem influenciar diferentes componentes da formação de novos vasos, incluindo a desestabilização da junção endotelial, a ativação de MMP, a migração de CEs e formação de tubo. Estudos recentes tem mostrado que a angiogênese induzida por inflamação está relacionada em parte, com produção localizada de NO e/ou ROS (Granger and Senchenkova, 2010; Ushio-Fukai and Urao, 2009).

Produção de aumentada de ROS e uma redução da biodisponibilidade do NO podem também contribuir para a formação de trombo que acompanha a inflamação (Granger and Senchenkova, 2010; Ushio-Fukai and Urao, 2009). O NO inibe a função plaquetária e evita a trombose, enquanto as ROS (particularmente superóxido) promovem a agregação plaquetária e trombose (Granger and Senchenkova, 2010). Um papel para ROS no desenvolvimento do trombo foi demonstrada em arteríolas cerebrais submetidos a fotoativação (que

gera ROS). Neste modelo, a formação de trombos de plaquetas foi inibida por sulfóxido de dimetilo (DMSO), um captador de radicais hidroxilo, e pela SOD. A formação do trombo induzido pela aplicação iontoforética de ADP (Adenosina difosfato) em vénulas mesentéricas é fortemente atenuada pelo tratamento com SOD e, em menor medida, pela administração de catalase. O inibidor de NOS não seletivo L-NAME, aumenta a atividade da ADP-induzida no crescimento do trombo, enquanto a administração de L-arginina não teve efeito. A inibição da NOS também melhora o desenvolvimento de trombos nas arteríolas e vénulas feridas por fotoativação, enquanto doadores de NO e NO-ativadores independentes da guanilato ciclase (ex, YC-1) foram relatados como tendo capacidade para inibir o desenvolvimento de trombos na microcirculação de maneira dose-dependente (Broeders et al., 1998; Freedman, 2008).

3.4.3. Inflamação & Angiogênese

A angiogênese é normalmente um processo estritamente controlado que ocorre esporadicamente no organismo adulto, porém sabe-se que existem um certo número de condições patológicas que são conhecidos por estarem associados com a angiogênese aberrante. Estas condições incluem o câncer, artrite reumatóide, doenças isquêmicas do coração e doenças inflamatórias crônicas (doença de Crohn's). Nestas condições há o aparecimento de vasos sanguíneos neo-formados no tecido de granulação, e no estroma tumoral. Além disso, há evidências da dupla funcionalidade dos fatores angiogênicos ou seja apresentam efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos (Koutroubakis et al., 2006; Nagy et al., 2008). Também há evidências crescentes de que a angiogênese, que acompanha a inflamação crônica tende a prolongar e intensificar a resposta

inflamatória. Resultados experimentais descrevem um agravamento da doença, lesão de tecidos e inflamação do cólon na doença inflamatória intestinal (IBD) experimental pela administração ou sobre-expressão genética de VEGF-A, enquanto o tratamento de camundongos com coliti-inflamatória com agentes anti-angiogênicos ou superexpressão genética de VEGFR-1 teve o efeito oposto (Chidlow et al., 2010). Esses achados levaram à proposta da utilização de drogas anti-angiogênicas no tratamento da IBD (Granger and Senchenkova, 2010).

3.5. FIBROGÊNESE

Os fatores de crescimento como TGF- β 1 e citocinas como o TNF- α liberadas no local da lesão induzem a proliferação e migração de fibroblastos, os quais depositam progressivamente elevadas quantidades de matriz extracelular. Os colágenos fibrilares presentes formam uma porção principal do tecido conjuntivo em locais de reparação e finalmente a estrutura de granulação é convertida em uma cicatriz composta de fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e outros componentes da MEC. O equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC resulta na remodelação da estrutura do tecido conjuntivo, um aspecto importante na inflamação crônica e reparação de ferida (Kuppahally et al., 2006; Prakash and Robbins, 2001).

Esses componentes do tecido fibrovascular proliferativo (Inflamação, Angiogênese e Fibrogênese) podem ser modulados por diferentes tipos de fármacos entre eles os inibidores da enzima Xantina Oxidase.

3.6. XANTINA OXIDASE

A xantina oxidoreductase (XOR) é uma molibdoflavoenzima complexa, presente em duas formas funcionalmente diferentes: a forma desidrogenase (forma XDH; EC.1.1.1.204), que produz NADH e urato e, pode ser transformada em xantina oxidase (forma XO; EC.1.2.3.22), oxigênio-dependente, que é responsável pela formação do radical ânion superóxido (O_2^-) e/ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McManaman et al., 1999; Saban-Ruiz et al., 2013). A XO catalisa as duas últimas reações na cadeia bioquímica que conduz à formação do ácido úrico, particularmente a conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, produzindo ânion O_2^- , por cada conversão como mostra a figura 3. XO é, portanto, uma fonte crítica de espécies reativas de oxigênio (ROS). Níveis elevados de ROS, diminuem a produção endógena de óxido nítrico e, assim, a capacidade antioxidante no sistema é reduzida (Pacher et al., 2006).

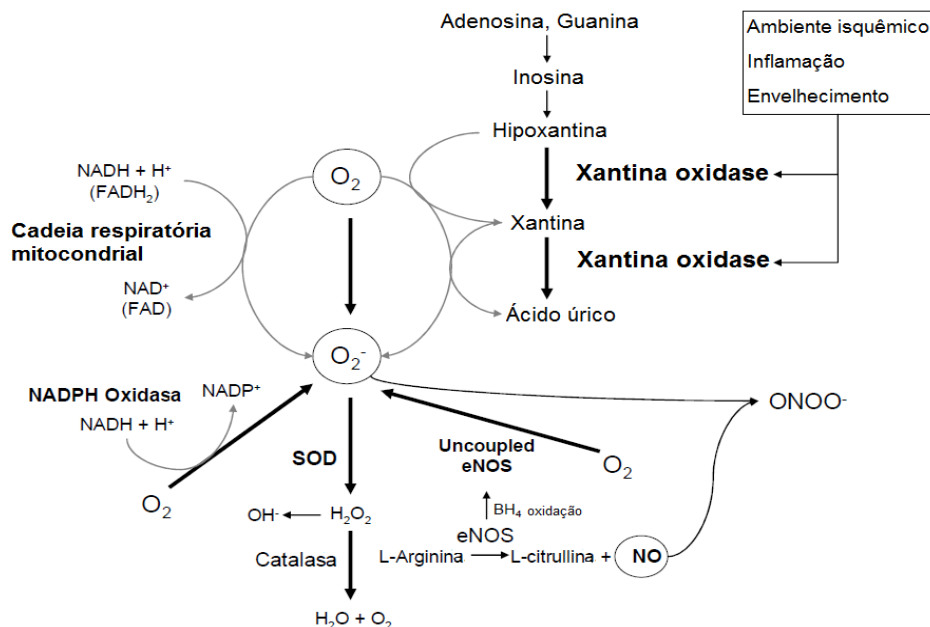


Figura 3- Biosíntese do ácido úrico. A xantina oxidase catalisa as duas últimas reações bioquímicas na cadeia que conduzem à formação do ácido úrico, particularmente a conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico. **BH4**: tetrahydrobiopterina, **eNOS**: óxido nítrico sintase endotelial, **NO**: óxido nítrico, **ONOO-**: peroxinitrito. **SOD**: enzima superóxido dismutase. Modificado de SABÁN-RUIZ et al., 2013.

XOR é transcrita a partir de um único gene como XDH, cujos elétrons são transferidos do co-factor de molibdênio (Mo), através de dois centros de Fe/S para co-factor dinucleótido de flavina e adenina (FAD). A XO totalmente reduzida contém um total de seis elétrons e sua reoxidação envolve a transferência de elétrons de moléculas de oxigênio, que gera H_2O_2 e O_2^- . Nos primeiros passos existem duas oxidações de elétrons para formar peróxido de hidrogênio, enquanto que os últimos passos um elétron é oxidado para formar superóxido. No entanto, também é importante não subestimar a produção de H_2O_2/O_2^- de acordo com a concentração de O_2 e as condições de pH. Assim, sob condições aeróbicas normais H_2O_2 é o principal ROS produzido (72% a 21% de O_2), e sob condições inflamatórias sua produção é ainda mais elevada (86-90% em 1-2% de O_2) (Kelley et al., 2010; Saban-Ruiz et al., 2013).

Outro fato importante é que o nível de expressão de XOR sob condições fisiológicas normais ocorre principalmente na forma desidrogenase, com os mais altos níveis encontrados no intestino e no fígado, mas durante condições inflamatórias ou de fenômenos de stress, tais como lesão de reperfusão pós-isquemia, é facilmente convertida em XO por oxidação dos resíduos de sulfidril ou por proteólise (George and Struthers, 2009; Glantzounis et al., 2005; Guthikonda et al., 2003; Malik et al., 2011; Puig and Martinez, 2008; Saban-Ruiz et al., 2013). No entanto, no endotélio vascular os ROS são produzidos não só pela XO, mas também por XDH, o que mostra a atividade da oxidase parcial, tal como ocorre no ambiente isquêmico durante a inflamação vascular, grandes cirurgias, doença da artéria coronária e insuficiência contrátil do miocárdio induzida por citocina. Estas condições inflamatórias, nas quais há aumento na

degradação das bases purinas, levam a um aumento nos níveis de XO e, portanto, um aumento da geração de ROS pelo processo enzimático, resultando em alterações na função vascular (George and Struthers, 2009; Kelley et al., 2010; Malik et al., 2011; Saban-Ruiz et al., 2013). As células produzem uma elevação notável dos níveis de XO quando expostos a isquemia, a conversão de XDH para XO é também acelerada na hipóxia (Kayyali et al., 1998). No processo de envelhecimento vascular, caracterizado por disfunção endotelial, atribuído principalmente ao aumento da produção de superóxido, o incremento da atividade dos radicais livres, que leva a disfunção vascular é causado pela XO, mas não pela NADPH oxidase (NEWAZ et al., 2006).

Também tem sido demonstrado que a XO secundariamente leva à formação de peroxinitrito. O ânion peroxinitrito é um dos mais poderosos das espécies reativas produzidas pela reação do óxido nítrico e do superóxido. Ele é considerado como um marcador de espécies reativas de oxigênio induzida pelo óxido nítrico sintase induzível (iNOS), acompanhado por stress oxidativo (Doehner et al., 2002; Guthikonda et al., 2003).

A XO inicialmente foi considerada um marcador de lesão hepática, uma vez que, agentes hepatotóxicos como o alotano e o etanol induziam liberação sistêmica da mesma (Giler et al., 1977; Giler et al., 1976; Zima et al., 1993), posteriormente Freeman e colaboradores demonstraram que esta enzima atua como um mediador circulante responsável pela lesão em órgão remoto em uma variedade de condições fisiopatológicas tais como: Isquemia/reperfusão, choque hemorrágico, aterosclerose e doença de células falciformes (Aslan et al., 2001;

Houston et al., 1999; Tan et al., 1995; Tan et al., 1998; Tan et al., 1993; White et al., 1996; Yokoyama et al., 1990). A XO mais importante na patogênese da lesão é a enzima circulante e depositada no local da lesão, em comparação com a Xantina Oxidase constitutivamente contida nas células endoteliais a qual tem um papel importante na sobrevivência destas células (Kou et al., 2008; Pacher et al., 2006).

Para o tratamento dos efeitos indesejáveis da enzima circulante foram desenvolvidos os inibidores da Xantina Oxidase. Entre eles o mais conhecido e estudado é o Alopurinol.

3.7. ALOPURINOL E OS SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

O alopurinol, tem sido a pedra angular do manejo clínico de gota e condições associadas com hiperuricemia por várias décadas (Pacher et al., 2006), mas, no entanto dados mais recentes indicam que XO também desempenha um papel importante em várias formas de isquemia e outros tipos de lesões vasculares, doenças inflamatórias, e insuficiência cardíaca crônica, tanto modelos animais (Berry and Hare, 2004; Harrison, 2002; Harrison, 2004; Pacher et al., 2006) como em ensaios clínicos em humanos (Pacher et al., 2006). O alopurinol é um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese do ácido úrico. É eficaz no tratamento da hiperuricemia primária da gota e secundária aos distúrbios hematológicos ou terapia antineoplásica (Bieber and Terkeltaub, 2004; Pea, 2005; Rott and Agudelo, 2003; Schlesinger, 2004; Terkeltaub, 2003; Wortmann, 2005).

A inibição da XO é responsável pelos principais efeitos farmacológicos do alopurinol. Nos humanos, o ácido úrico é produzido principalmente pela oxidação da hipoxantina e da xantina, catalisada pela XO. A inibição da biossíntese do ácido úrico reduz sua concentração plasmática e a excreção renal dos precursores mais solúveis das oxipurinas (Hestlin and Johns, 1999; Linas et al., 1990; Rhoden et al., 2000), e assim impede a formação de O_2^- derivado da XO o que a sua vez diminui a produção de H_2O_2 e $ONOO^-$ (Saban-Ruiz et al., 2013) como se observa na figura 4.

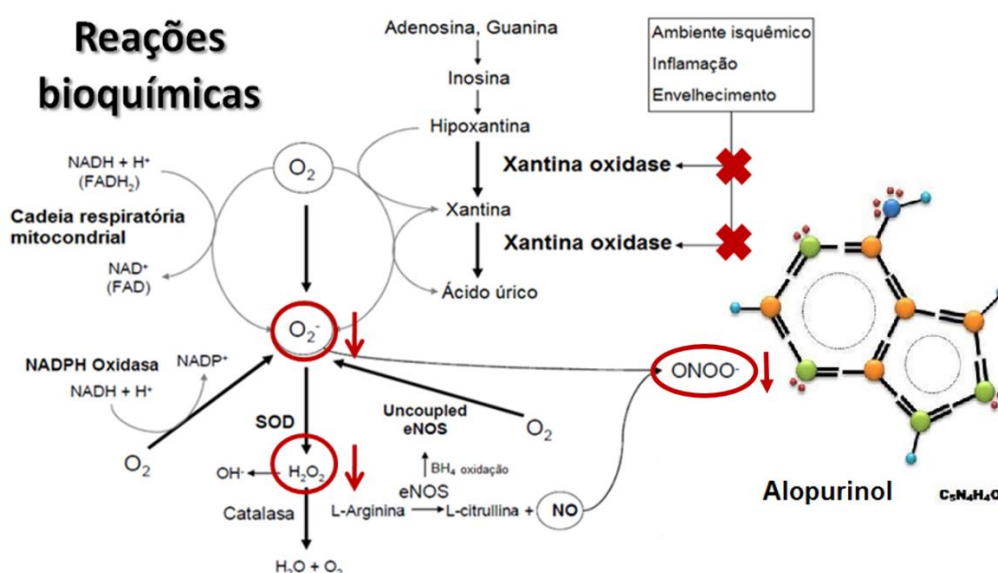


Figura 4- Efeito do alopurinol sobre a XO. Particularmente a inibição da conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, a qual reduz a produção de O_2^- , H_2O_2 e $ONOO^-$ (Círculos e setas em vermelho). O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, NO: óxido nítrico, $ONOO^-$: peroxinitrito. Modificado de SABÁN-RUIZ et al., 2013.

O Alopurinol apresenta efeitos antioxidantes e antiinflamatórios que conferem-lhe numerosas aplicações terapêuticas potenciais em diversas formas de isquemia e outros tipos de doenças vasculares como, doenças inflamatórias e insuficiência cardíaca crônica. Considerando esses efeitos do composto já descritos em outros modelos, nos postulamos que o Alopurinol poderia modular a angiogênese inflamatória e reparo tecidual no modelo murino de implante de matriz sintética.

4. JUSTIFICATIVA

O Alopurinol é um isômero da hipoxantina e um inibidor enzimático da Xantina Oxidase (XO) que inibe a formação de ROS apresentando um efeito modulador na inflamação promovida pelo estresse oxidativo. Os níveis sistêmicos de XO são significativamente elevados em diversos estados patológicos tais como inflamação, isquemia-reperfusão e no envelhecimento, onde a formação de ROS derivado de XO está implicada no dano oxidativo. É possível por tanto, que o bloqueio da via enzimática pela ação farmacológica do alopurinol na fase aguda e crônica do processo inflamatório, seja significativo para modulação da resposta inflamatória e angiogênica induzida pelo implante de matriz sintética de poliéter-poliuretano no subcutâneo da região dorsal de camundongos, além de participar ou atuar de forma determinada dentro do processo de reparo tecidual interno.

A falta de avaliação dos efeitos do bloqueio farmacológico da enzima Xantina Oxidase com Alopurinol, sobre angiogênese inflamatória. Bem como o fato de não existirem reportes do efeito deste composto sobre a reparação tecidual interna. E a disponibilidade de dados controversos na literatura dos efeitos da administração deste fármaco em vários modelos de isquemia e inflamação justifica o desenvolvimento desta investigação.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do alopurinol na angiogênese inflamatória induzida pelo implante de uma matriz sintética de poliéter-poliuretano em camundongos, quando iniciada sua administração em fases diferentes (aguda e crônica) do processo de formação do tecido fibrovascular proliferativo.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma curva dose-resposta do alopurinol para determinar a dose mínima efetiva do fármaco.
- Analisar o efeito da inibição da enzima Xantina Oxidase com Alopurinol sobre os parâmetros: inflamatórios, angiogênicos, produção de ânion superóxido/Oxido Nítrico e fibrogênicos quando iniciado o tratamento 24h pós-implante da matriz sintética (fase aguda).
- Avaliar o efeito da inibição da Xantina Oxidase com Alopurinol nos componentes do tecido fibrovascular proliferativo induzido pelo implante da matriz sintética quando iniciado o tratamento em uma fase crônica (8 dias pós-implante).
- Determinar um possível efeito sistêmico do Alopurinol mediante avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo de animais tratados e não tratados na fase aguda

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados animais C57BL6 machos com idade de 6 a 7 semanas, pesando entre 18 e 22 gramas, provenientes do Centro Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e a ração à vontade. Protocolo CETEA/CEUA 007/2011.

6.2. IMPLANTES DE MATRIZ SINTÉTICA

6.2.1. Obtenção dos discos de matriz sintética

Foram fabricados discos de esponjas de 0,8cm de diâmetro e 5mm de espessura de uma placa de Poliéter-poliuretano (Vitafoam Ltda., Manchester, UK) utilizando um *punch* cirúrgico. Os mesmos foram colocados em etanol 70% v/v durante um mínimo de 24h antes da implantação. Previamente à implantação, os discos de poliéter-poliuretano foram lavados e fervidos em água destilada por no mínimo de 30 minutos.

6.2.2. Implantação das matrizes sintéticas

Realizou-se implantação do disco de poliéter-poliuretano no espaço subcutâneo do dorso de cada animal, para indução de um microambiente inflamado, e formação do tecido fibrovascular favorecendo o desenvolvimento da angiogênese inflamatória (Andrade et al., 1987). Para o procedimento cirúrgico de implantação os camundongos foram anestesiados com solução de xilazina/cetamina (10 mg/kg e 80 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal

e submetidos à tricotomia e à assepsia do dorso para implante da matriz sintética no espaço subcutâneo deste local. **Solução de xilazina/cetamina:** cetamina a 10% (100 mg/ml); xilazina a 2% (20 mg/ml); Misturar 1 ml de cetamina + 0,5 ml de xilazina + salina estéril a 0,9% 8,5 ml. Foi usado 0,1 ml/10g de peso do camundongo. Logo após realizou-se uma incisão de mais o menos 0,5 cm, na pele da região lombar dos animais. Após delicada divulsão do tecido subcutâneo desde a incisão até o dorso cervical, o implante foi cuidadosamente posicionado no espaço subcutâneo. Após retirar o enfisema subcutâneo fechou-se a incisão com sutura cirúrgica (fio de sutura agulhado 4-0 PROCAFRE®). Depois da cirurgia, os animais foram mantidos em período de observação para avaliação de mudanças em seu estado geral que pudessem ser considerados sinais de desconforto ou sofrimento. Na ausência dos mesmos e após a recuperação total da anestesia, os camundongos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum* (Andrade et al., 1987).

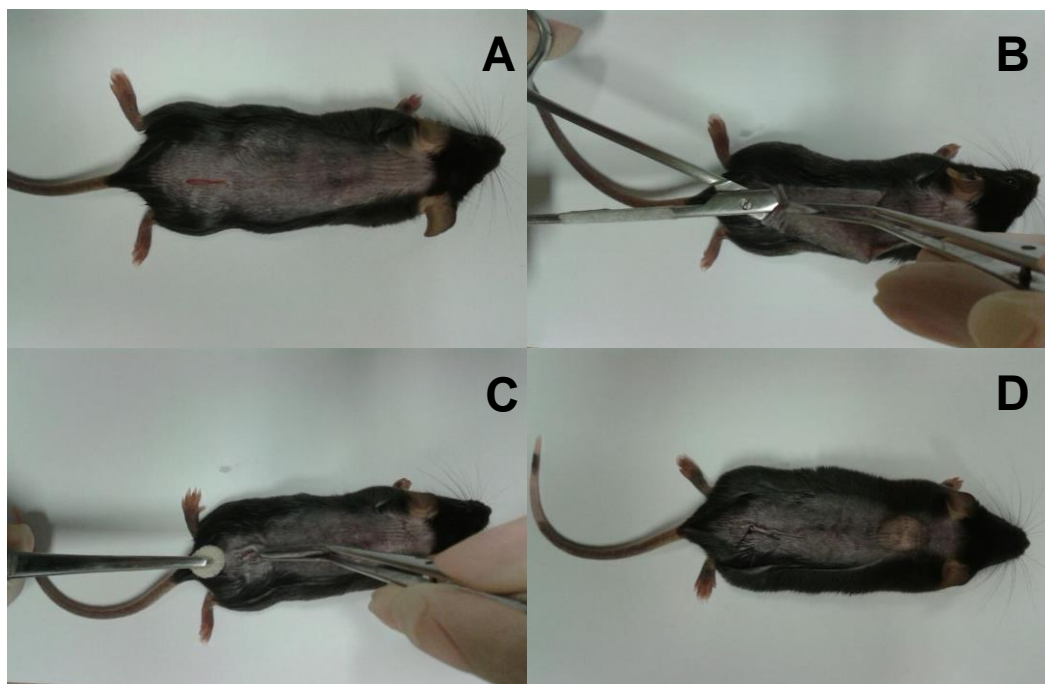


Figura 5- Esquema do implante de matriz sintética. **A** Incisão; **B** Divulsão do tecido subcutâneo; **C** Colocação do implante na região dorsal; **D** Fechamento da incisão com fio de sutura.

6.2.3. Retirada do implante de matriz sintética

Em data pré-estabelecida, todos os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico: Solução de xilazina 2% (10mg/Kg) + cetamina 10% (80mg/Kg), preparada em solução salina estéril a 0,9% e administrado por via intraperitoneal em concentração 3 vezes maior (xilazina: cetamina = 50:400mg/Kg). 24 horas após o último tratamento – 7º dia pós-implante (Angiogênese inflamatória aguda) e – 14º dia pós-implante (Angiogênese inflamatória crônica). Logo após a eutanásia os implantes foram removidos, pesados e processados para estudos de análises: bioquímica, histológica e funcional. As carcaças dos animais experimentais foram devidamente acondicionadas em saco branco leitoso com a simbologia de infectante e depositadas em freezer -20°C, para disposição do pessoal encarregado.

6.3. PREPARO DAS SOLUCÕES DE ALOPURINOL

Para a aplicação em camundongos, o composto alopurinol (Zyloric®) foi preparado em água filtrada em diferentes concentrações para alcançar as doses de: 0,01; 0,1 e, 1 mg/Kg de peso com o fim de obter a mínima dose efetiva. A posologia humana do fármaco é de 1mg/Kg considerando-se uma média de peso corporal de 70 Kg.

6.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Primeiro protocolo: Angiogênese inflamatória aguda

Este protocolo teve dois objetivos:

O primeiro foi determinar a dose mínima efetiva do fármaco, para o qual foram implementadas as doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg de peso sendo esta última dose análoga a dose utilizada na clínica para o tratamento da gota.

O segundo objetivo foi avaliar os efeitos do composto sobre angiogênese inflamatória quando iniciado o tratamento na fase aguda (logo após o estímulo inicial) do processo de formação do tecido fibrovascular proliferativo.

Para este protocolo os animais foram divididos em quatro grupos, sendo três tratados com alopurinol e um controle, a terapia foi administrada por gavagem para todos os grupos.

Grupo 1 (n=15) foi tratado com uma dose diária de 0,01 mg/Kg de peso de alopurinol em 100 µL de suspensão por 6 dias consecutivos, sendo a primeira dose administrada 24 h após o implante.

Grupo 2 (n=8) recebeu 0,1 mg/Kg de peso em 100 µL na mesma frequência e tempo que o grupo 1.

Grupo 3 (n=8) foi tratado com 1 mg/Kg de peso nas mesmas condições dos grupos anteriores.

Grupo 4 (controle n=15) recebeu 100 µL do veículo (água filtrada) mesmas condições dos grupos tratados.

O número de animais por grupo foi escolhido por experimentos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Almeida et al., 2014; Belo et al., 2001; Sampaio et al., 2012).

Segundo protocolo: Angiogênese inflamatória crônica

Neste protocolo, após estabelecer que a dose maior do fármaco (1mg/Kg) apresentasse melhores resultados ao nível estatístico e levando em conta que é a dose análoga a administrada na clínica para o tratamento da gota, nós nos pranteamos analisar qual era o efeito modulador desta dose sobre os componentes do tecido fibrovascular proliferativo quando iniciado o tratamento na fase crônica.

Grupo tratado (n= 9) recebeu com 1mg/Kg de peso de alopurinol em 100 µL de suspensão por 6 dias consecutivos, sendo a primeira dose administrada 8 dias após o implante.

Grupo controle (n= 9) recebeu 100 µL do veículo (água filtrada) nas mesmas condições do grupo anterior.

O número de animais por grupo foi calculado considerando um desvio máximo (s) de 0,3 (30%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,5 (50%), considerando o poder do teste de 90% e nível de significância 0,05, o valor de C será de 10,51 ao aplicar a fórmula $n = 1 + [2C*(s/d)^2]$, temos $n=1+[2*10,51*(0,3/0,5)^2] = 8,5672 = 9$.

O valor de desvio padrão e diferença esperada foram obtidos dos dados de experimentos anteriores, relacionados com testes de fármacos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (Almeida et al., 2014; Araujo et al., 2010; Belo et al., 2001; de Souza et al., 2014; Mendes et al., 2009; Sampaio et al., 2012; Xavier et al., 2010).

6.5. ANÁLISE DE PARÂMETROS DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS INTRAIMPLANTE

6.5.1. Dosagem de hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intra-implante quantifica indiretamente a neovascularização presente nos tecidos e tem sido utilizada como índice de vascularização em modelos de angiogênese. Esta técnica utiliza o método do reagente de Drabkin (Araujo et al., 2011; Ferreira et al., 2004; Marques et al., 2011; Mendes et al., 2009).

Após a remoção, os implantes foram cortados em três partes, Após a pesagem um dos fragmentos foi homogeneizado (Tekmar TR-10; Ohio, EUA) em 1,5 mL de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil) e centrifugados a 10000 rpm por 40 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22 µm (Millipore) e colocados em placas com 96 poços. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540 nm e a [Hb] determinada por comparação a uma curva padrão de hemoglobina microgramas (µg) por miligrama (mg) de peso úmido do implante (Barcelos et al., 2005; Ferreira et al., 2004).

6.5.2. Quantificação das citocinas VEGF, CCL-2, TNF- α e TGF- β 1

Para a determinação dos níveis destas citocinas nos implantes, foram utilizados 100 μ L do sobrenadante restante da dosagem de hemoglobina. Para a realização do processo, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicada em placa de ELISA que continham um anticorpo de detecção. Após, realizar a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram, foi adicionada uma solução de substrato à placa de ELISA (50 μ L de uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10 mg/ml de OPD –Sigma). A reação foi interrompida após de 20 minutos de incubação com 50 μ L de ácido sulfúrico 2N e a intensidade da cor, foi quantificada a 540 nM em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos em picograma (pg) de citocina por mg de peso úmido.

6.6. ANÁLISE DE DENSIDADE VASCULAR

6.6.1. Avaliação histológica

Para o estudo histológico, implantes de animais controle (n=5) e animais tratados com alopurinol 1 mg/Kg de peso (n=5) foram utilizados. Os implantes foram fixados em formol tamponado a 10% durante 24 horas e processados para inclusão em parafina. As seções de 5 μ m obtidas foram coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE) para quantificação da área fibrovascular e número de vasos e processados para estudos microscópicos. Para a análise morfométrica, imagens dos cortes histológicos (área de 4795 μ m²) dos implantes foram capturadas por uma objetiva panacromática (5X) em luz microscópica (ampliação final = 50x). As imagens foram digitalizadas através de uma microcâmara JVC TK-1270/JCB e analisadas usando o Image Pro-Plus software

(Media Cybernetics Inc., USA). Para contagem de vasos, se considerou um desses a cada estrutura com lúmen e contendo emacias. A quantidade de vasos foi calculada dividindo o número de vasos obtidos pela média \pm s.e.m. da área dos cortes (μm^2). Realizou-se este procedimento para cada lâmina.

6.7. DETERMINAÇÃO DE PARÂMEROS INFLAMATÓRIOS

6.7.1. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos é um indicador de inflamação. A mieloperoxidase é uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos sendo, portanto utilizada como marcador indireto do recrutamento desse tipo celular (Araujo et al., 2010; Campos et al., 2008; Moura et al., 2011; Xavier et al., 2010).

Inicialmente, o sedimento destinado à dosagem de MPO foi homogeneizado e ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A atividade de MPO no sobrenadante foi mensurada através da variação da absorvância (densidade óptica; DO) a 450nm. Às amostras (100 μL) foram adicionados 100 μL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina 1,6mM (TMB; Sigma) preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) concomitantemente com 100 μL de tampão fosfato 80 mM (pH 5,4) contendo peróxido de hidrogênio 0,3 mM (Sigma). A reação foi paralisada com a adição de 100 μL de ácido sulfúrico 4 M e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca (Thermoplaste). Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) por miligrama de tecido úmido.

6.7.2. Avaliação da atividade da *n*-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

A avaliação do recrutamento e ativação de macrófagos nos implantes pode ser feita pela intensidade da atividade da enzima NAG, presente em altos níveis nos lisossomas deste tipo celular quando ativados (Bailey, 1988; Belo et al., 2004). O substrato para esta dosagem foi homogeneizado em solução de NaCl 0,9% (Synth) contendo 0,1% de Triton X-100 (Promega) e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a realização do ensaio as amostras foram diluídas em Tampão citrato/fosfato (pH 5,4) em uma relação 1:5, logo após foram colocados 100 μ L das amostras diluídas em duplicada em uma placa de 96 poços. Posteriormente foram adicionados 100 μ L do substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidase (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (pH 5,4) em uma concentração final de 2,34 mM (para obter uma diluição homogênea, este preparado é sonificado pelo tempo que for necessário em ultrassom –QUIMIS®). Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida adicionando-se 100 μ L de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). A absorbância foi medida por leitor de microplaca (Thermoplate) em comprimento de onda de 400 nM. Os resultados foram expressos em nanomol (Nmol) por miligrama de tecido úmido.

6.8. MEDIÇÃO DIRETA DE NO E H₂O₂

6.8.1. Mensuração direta dos níveis de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As células produzem uma elevação notável dos níveis de XO quando expostas a isquemia, a conversão de XDH para XO é também acelerada na hipóxia (Kayyali et al., 1998). Pelo anterior foram realizadas mensurações diretas de NO

e H_2O_2 , como medição indireta da atividade da XO, para as quais grupos de animais controle e tratado (n=5) foram utilizados. Após eutanásia dos animais, os implantes foram removidos, partidos ao meio e pesados. Para o processamento do tecido utilizou-se um almofariz de porcelana, verteu-se uma pequena quantidade de nitrogênio líquido, imediatamente após (ainda na efervescência), foi depositada a esponja e macerada com pistilo (porcelana) até obter um pó homogêneo. Logo após, deixou-se o homogenato em repouso em temperatura ambiente. Adicionou-se o tampão para diluir (tampão fosfato pH 4,5; 1 mL por 0,2 g de tecido). Finalmente, colocou-se uma alíquota de 300 μL em um eppendorf com cloreto de cobre e realizou-se a mensuração direta do NO utilizando-se um macroeletrodo com membrana polimérica permeável a este gás (TBR4100 Free Radical Analyzer). Os valores de corrente foram convertidos em concentrações de NO (nM) utilizando-se uma curva padrão SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-oenicillamine) (Figura 6 –Linha verde e quadro inferior esquerdo). Para a dosagem de H_2O_2 uma alíquota de 150 μL do mesmo homogenato foi colocada em um eppendorf com PBS (tampão fosfato 0,01 M, cloreto de potássio 0,0027 M e cloreto de sódio 0,137 M, em 200 mL de água deionizada; pH: 7,4) e realizou-se a mensuração direta do H_2O_2 utilizando macroeletrodo com membrana polimérica permeável a ele, os valores de corrente foram convertidos em concentrações de H_2O_2 (μM) utilizando uma curva padrão de H_2O_2 (Figura 6 –Linha vermelha e quadro inferior direito).

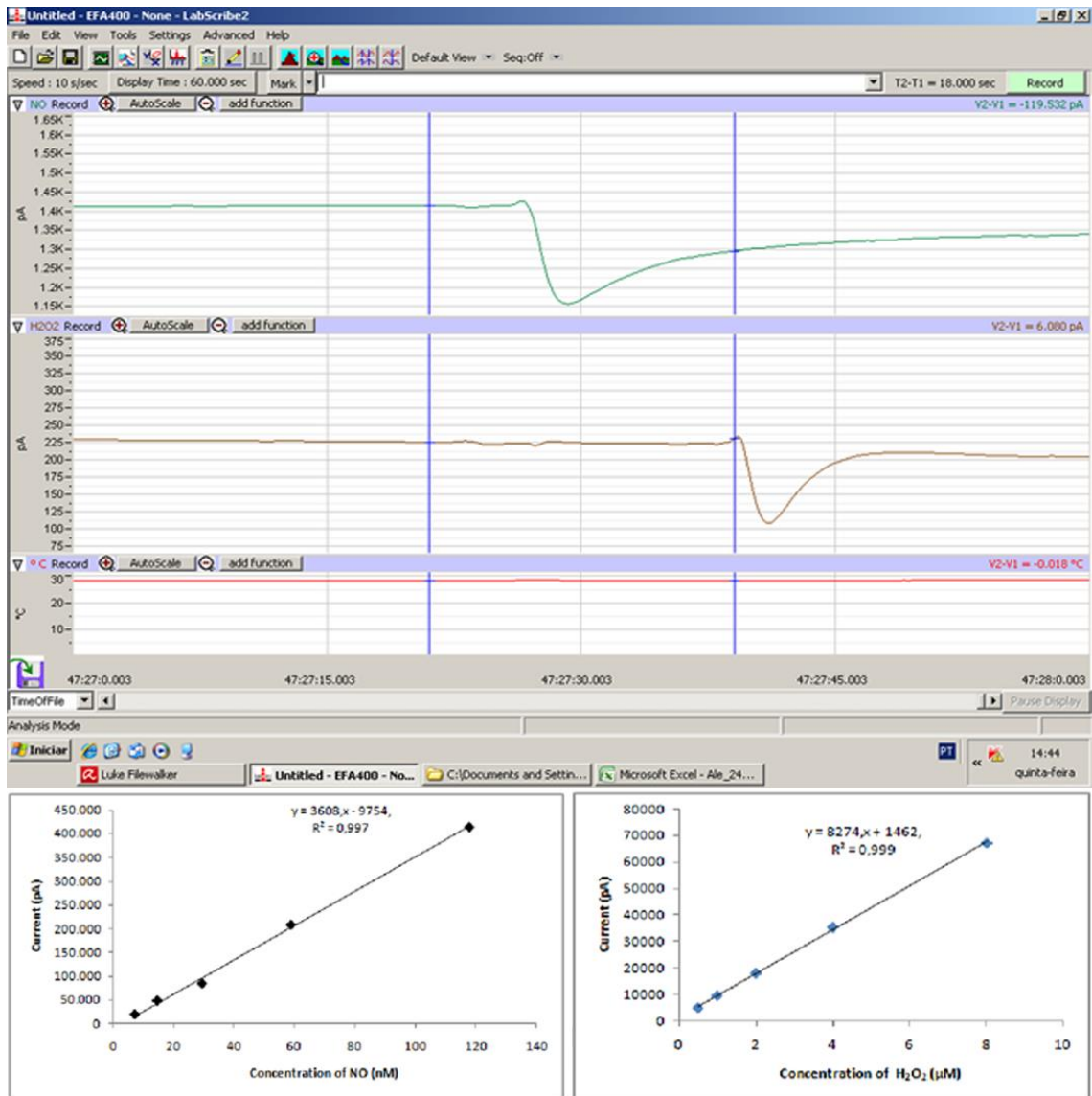


Figura 6- Medição direta de gases através de macroeletrodo sensível. Na parte superior Print screen do traçado das curvas de NO e H₂O₂. registradas durante a mensuração direta dos gases. Em baixo as curvas padrões utilizadas para conversão dos dados de corrente (pA) para concentração de NO (nM) e H₂O₂ (µM).

6.8.2. Quantificação de colágeno

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada por colorimetria, baseada na reação de picosirius red (Mendes et al., 2009; Phillips et al., 2004). Os implantes foram homogenizadas com salina/Triton-X100 (pH 7,8) e depois centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 50 µL do reagente picosiriusred a 25 µL da amostra. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-picosiriusred foi

novamente centrifugado, a 3000 rpm por 10 minutos a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 500 µL de etanol (99% puro e livre de metanol –Synth) e o complexo colágeno-colorantes foi reconstituído em 1 mL de reagente alcalino NaOH 0,5 M (Synth). Após solubilização, as amostras foram transferidas para placa de 96 poços e lidas a 540 nM em leitor de microplacas. A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação de uma curva padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante.

6.9. AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO CUTÂNEO

6.9.1. Técnica de difusão da fluoresceína.

Esse procedimento foi realizado no dorso dos animais por meio de uma aplicação intradérmica de fluoresceína sódica com o objetivo de avaliar um possível efeito sistêmico do alopurinol. Quanto mais rápida (min) é a difusão da fluoresceína maior o fluxo sanguíneo local (Andrade et al., 1997). Para realizar esse procedimento, uma amostra de sangue da veia caudal do animal foi retirada para determinar a fluorescência basal do sangue. Em seguida, uma solução estéril (10 µl) de fluoresceína sódica (Sigma, USA; 1%) foi injetada e amostras sanguíneas de 5 µl foram coletadas da veia caudal nos tempos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 min. após a injeção.

Essas amostras foram misturadas em 1 mL de solução salina isotônica, centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para a determinação da fluorescência em um fluorímetro (Variam; excitação/emissão de 485/520). Os resultados foram expressos em tempo

(min) do pico de fluorescência na circulação sistêmica. Cinco animais de cada grupo foram utilizados para padronizar os parâmetros.

6.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios propostos foram validados por testes estatísticos adequados a cada modalidade (os dados foram submetidos a teste de distribuição normal). Os resultados foram expressos em média \pm SEM.

Comparações foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguida por fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Teste T foi utilizado para comparação de dois grupos. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05. Todos os dados estão expressos em média \pm s.e.m.

7. RESULTADOS

O implante de matriz sintética (poliéter-poliuretano) foi bem tolerado pelos animais. Não houve sinal de infecção ou rejeição do implante durante os 7 ou 14 dias de duração do experimento.

7.1. CURVA DOSE-RESPOSTA –ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA AGUDA VS CRÔNICA

Com o fim de determinar a dose mínima efetiva, realizou-se uma curva dose resposta, utilizando três doses diferentes do fármaco. A primeira dose estabelecida foi: 1 mg/Kg de peso, esta dose surgiu da extrapolação da dose humana mais comumente utiliza para tratamento da gota e hiperuricemia 1mg/Kg considerando-se uma média de peso corporal de 70 Kg (Bieber and Terkeltaub, 2004; Rott and Agudelo, 2003; Schlesinger, 2004; Terkeltaub, 2003; Wortmann, 2005), as doses subsequentes foram obtidas a partir de duas diluições de 10 vezes, sendo estas: 0,1 e 0,01 mg/Kg de peso.

7.1.1. PARÂMEROS INFLAMATÓRIOS:

Primeiramente nós avaliamos a atividade inflamatória induzida pela matriz sintética implantada, esta mensuração foi realizada através da quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) – (Figura 7A) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) – (Figura 7C) para a estimativa indireta do acúmulo de neutrófilos e de macrófagos, respectivamente. Observando uma diminuição dose dependente da atividade da MPO quando iniciado o tratamento na fase aguda, isto encontra-se em concordância com os achados de Margaritis e colaboradores, os quais demonstraram que a administração oral de alopurinol

previa a isquemia reduz a atividade da MPO em um modelo de isquemia/reperfusão intestinal em ratos (Margaritis et al., 2011), um efeito similar tinha sido mostrado por Grisham e colaboradores em 1986 em um modelo de isquemia/reperfusão intestinal em gatos onde descreviam uma atenuação da atividade de MPO que representava uma diminuição da quantidade da enzima e não a inibição da atividade catalítica de MPO por alopurinol (Grisham et al., 1986). Em referência a atividade da NAG, observamos uma redução estatisticamente significativa quando administrada a dose maior do composto, estando este resultado em concordância com o observado por Peto e colaboradores, os quais relataram uma redução da atividade desta enzima no modelo de isquemia/reperfusão renal quando administrado pré-tratamento com alopurinol antes da oclusão da artéria renal (Peto et al., 2005).

Como mencionado anteriormente a dose de 1 mg/Kg apresentou uma modulação estatisticamente significativa sobre todos os parâmetros avaliados na fase aguda além de que é a dose análoga a utilizada na clínica para o tratamento da gota, por isso nós decidimos avaliar qual era o efeito da mesma quando iniciado o tratamento na fase crônica do processo de formação do tecido fibrovascular proliferativo. Encontrando que embora esta dose não fosse capaz de modular a atividade da MPO (Figura 7B), produz uma modulação positiva da atividade da NAG (figura 7D), em contraste com o observado na fase aguda.

Nós avaliamos também níveis intra-implante das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e CCL-2 (Figuras 7E-H) observando uma diminuição dos níveis das duas citocinas, quando iniciado o tratamento na fase aguda (Figuras 6E e 6G) esses

resultados concordam com relatos da literatura que indicam que a administração pré-operatória de alopurinol (300 mg/Kg/dia por 5 dias) em pacientes submetidos a bypass cardíaco, diminui a inflamação e lesão miocárdica de acordo com parâmetros bioquímicos entre eles a quantificação em soro de TNF- α (Gormus et al., 2013). Já Baldwin e colaboradores em 2011 demonstraram que o ácido úrico induz in vitro um aumento na produção (mRNA e proteína secretada) de CCL-2 (Baldwin et al., 2011). No entanto, quando o tratamento foi iniciado na fase crônica produz uma modulação positiva destes parâmetros, não achamos na literatura estudos que avaliaram os mesmos em processos crônicos, sendo assim, nossos resultados da modulação destes parâmetros sugerem um duplo efeito do composto sobre os parâmetros inflamatórios dependendo da fase da formação do tecido fibrovascular proliferativo na qual é administrado.

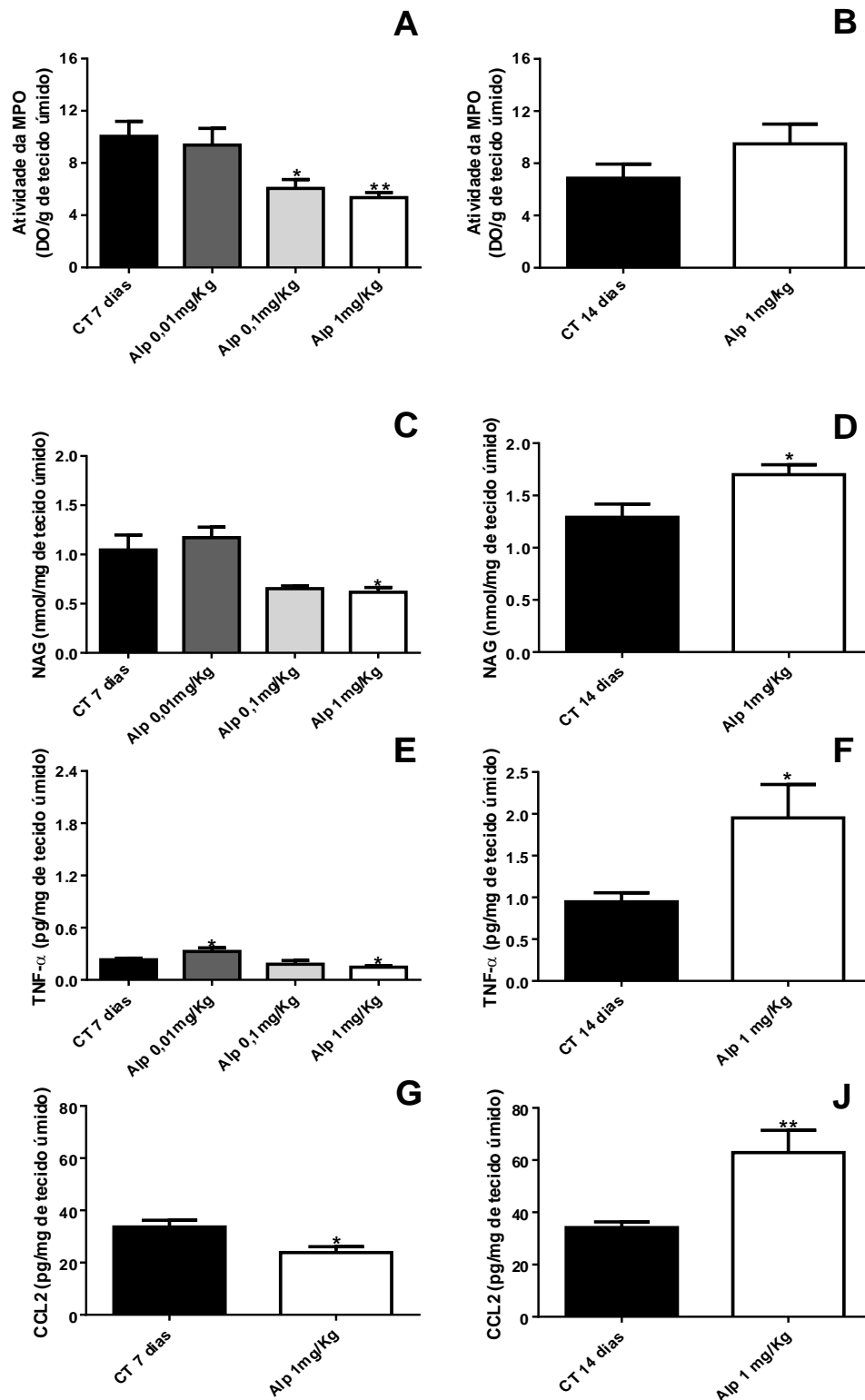


Figura 7- Efeitos do tratamento com alopurinol sobre os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzido por uma matriz sintética. Atividades das enzimas mieloperoxidase-MPO (A e B), da n-acetil- β -D-glucosaminidase -NAG (C e D), e a produção de citocinas TNF- α (E e F); CCL2 (G e J). Os marcadores inflamatórios diminuíram quando o tratamento foi iniciado 24 horas após o implante, mas aumentaram, quando o tratamento foi iniciado na fase crônica (8 dias pós-implante). Os valores são expressos em média \pm SEM de 9-15 animais em cada grupo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - t test Student.

7.1.2. PARÂMETROS DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS INTRAIMPLANTE.

Um efeito angiopreventivo foi observado nos implantes tratados durante a inflamação aguda, ao tempo que um efeito pró-angiogênico foi observado nos implantes tratados durante o processo crônico (após 8 dias de implantação). No exame macroscópico *In situ* mostrou diferença visível na intensidade da cor do implante entre o grupo controle e os animais tratados com alopurinol (Figuras 8A – D). A quantidade de hemoglobina em implantes de 7 dias controle antigos foi $2,96 \pm 0,34$ n = 15. Após o tratamento com alopurinol o valor médio de hemoglobina foi de $1,6 \pm 0,2$. Os níveis de VEGF foram também reduzidos pelo tratamento (Figuras 9 A e C). Um aumento no conteúdo de Hb foi observado nos implantes de 14 dias do grupo controle quando comparados com os implantes do grupo controle de 7 dias. O tratamento iniciado durante o processo inflamatório crônico aumentou este parâmetro em 50% (Figura 9B). No entanto os níveis de VEGF foram semelhantes nas amostras dos implantes do grupo controle e os dos animais tratados (Figura 8D). Estes efeitos duais de alopurinol na vascularização dos implantes foram confirmados histologicamente através da contagem do número de vasos sanguíneos nos cortes histológicos dos implantes (coloração HE; Fig. 10A-F).

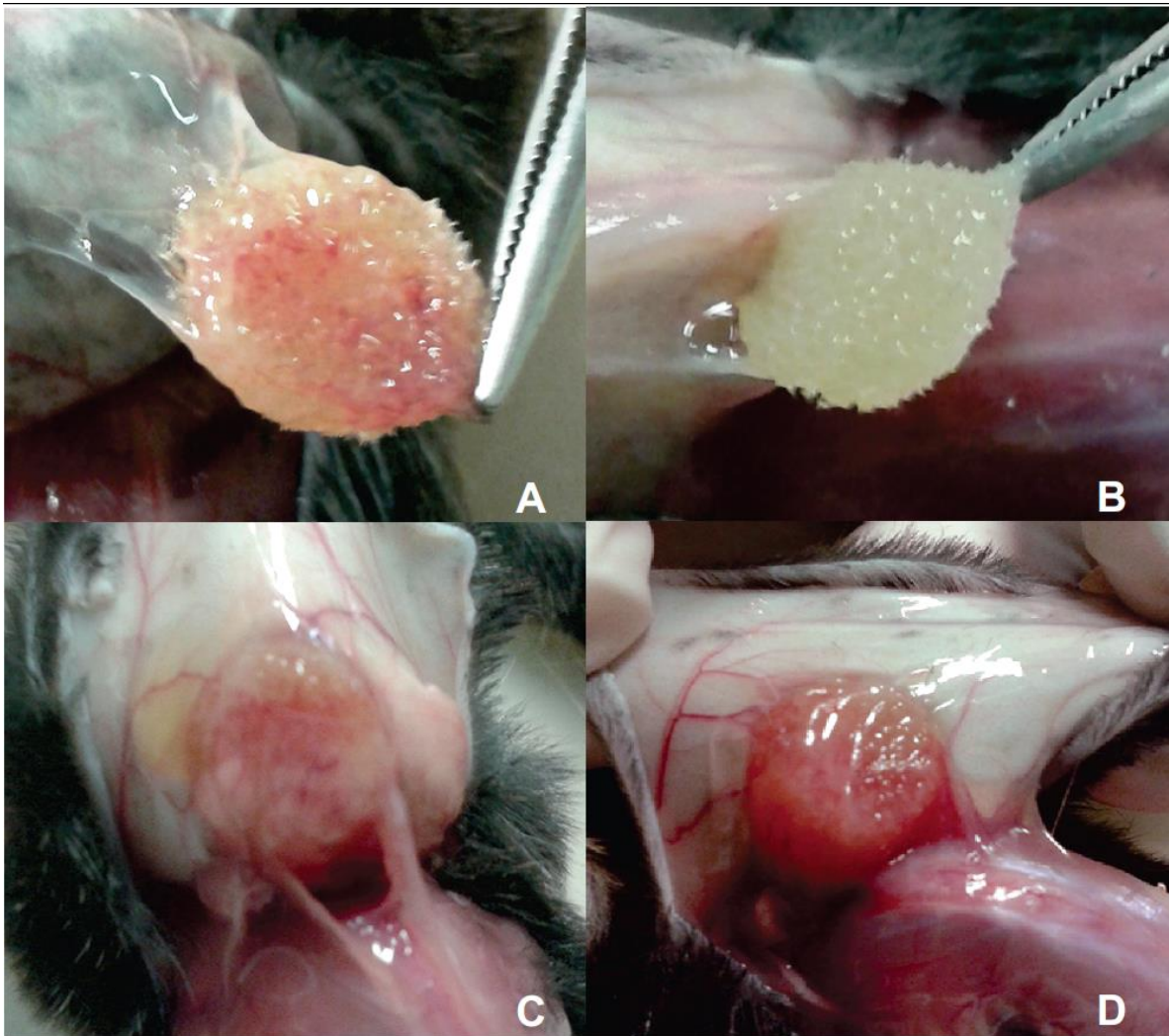


Figura 8- *Imagens in situ de implantes de 7 e 14 dias. Indicando diferenças macroscopicamente visíveis na quantidade de glóbulos vermelhos perfundidos no tecido fibrovascular dos implantes controle de 7 dias (A) e os implantes de animais tratados com alopurinol durante inflamação aguda (B). Observou-se também uma maior fibrose no implante controle de 14 dias (C) e células vermelhas do sangue perfundindo mais o tecido fibrovascular no implante retirado de animais tratados com alopurinol durante a inflamação crônica (D).*

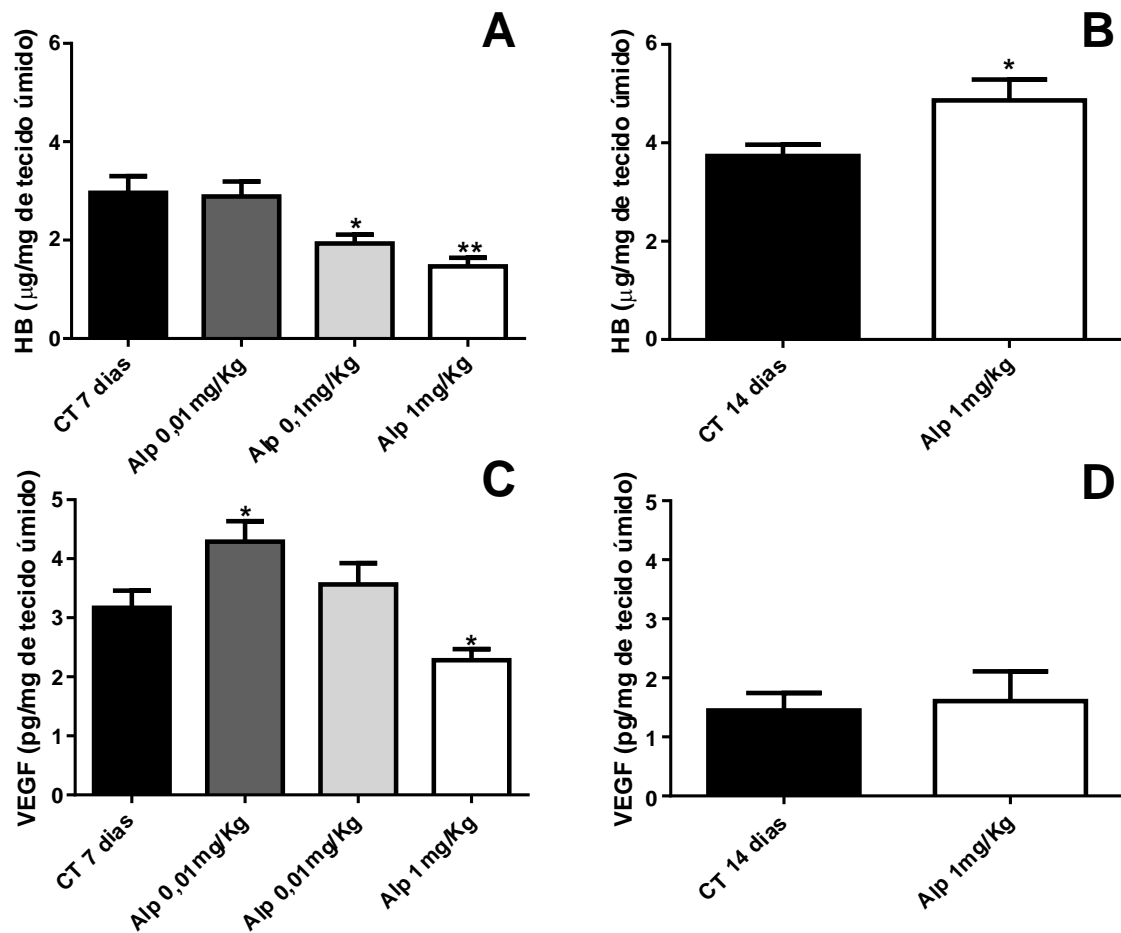


Figura 9- Efeitos do tratamento com alopurinol sobre os componentes angiogênicos do tecido fibrovascular induzido pelo implante de uma matriz sintética. Teor de hemoglobina (A e B) e os níveis de VEGF (C e D). Os parâmetros diminuíram quando o tratamento foi iniciado 24 horas após a implantação, mas aumentaram quando o tratamento começou 8 dias após a implantação. Os valores são expressos em média \pm SEM de 9-15 animais em cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - ANOVA e t de Student.

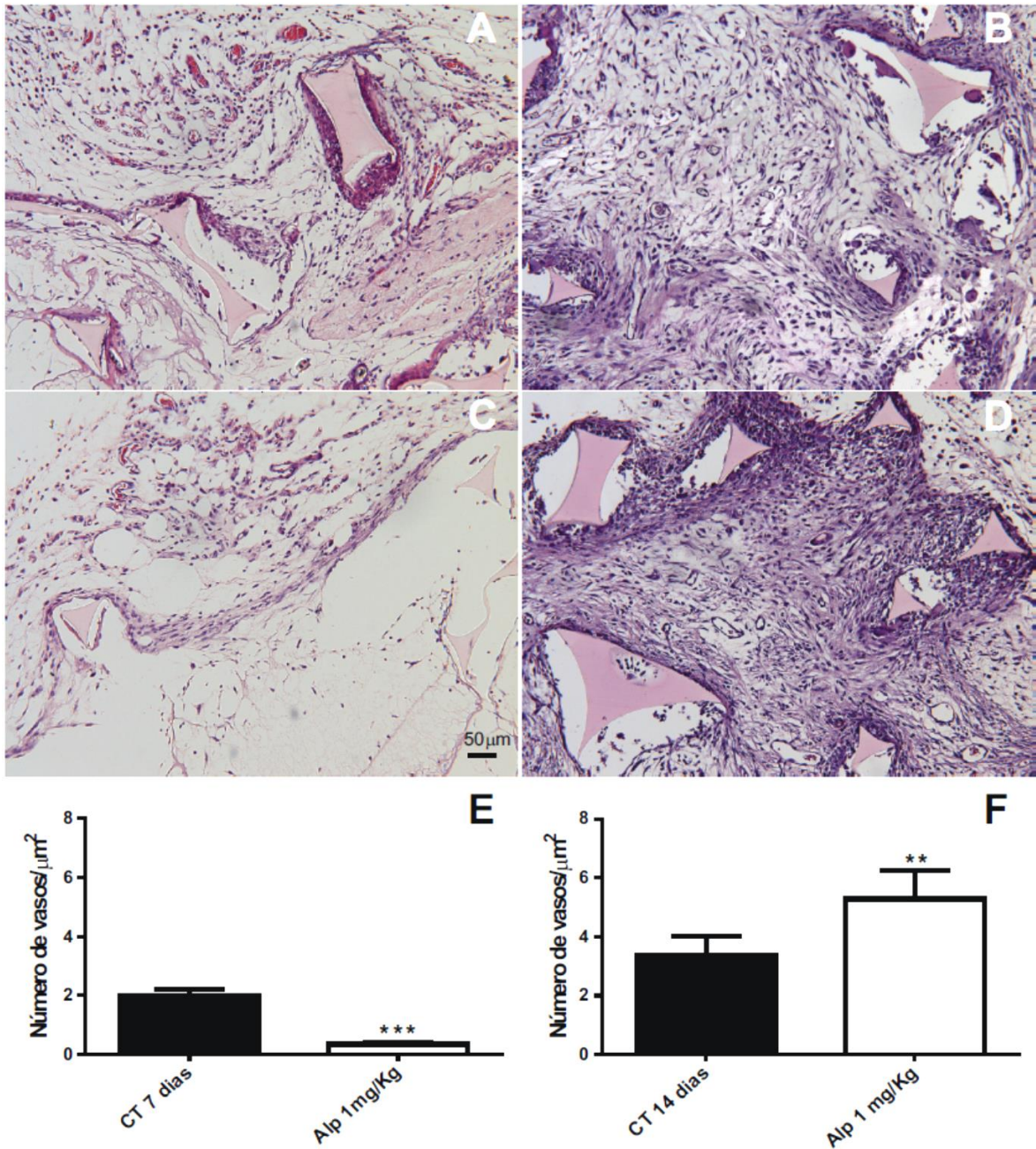


Figura 10- Cortes histológicas representativas de implantes de matriz sintética corados com Hematoxilina e Eosina (HE), mostrando o padrão de infiltração de tecido fibrovascular. A infiltração de tecido fibrovascular estava reduzida quando o tratamento foi iniciado 24 horas após a implantação (C), mas aumentada quando o tratamento começou 8 dias após a implantação (D). Em E - F, análises morfométricas do número de vasos em implantes dos animais controle (CT) em comparação com o de animais tratados com alopurinol (Alp 1 mg/Kg). Os valores são expressos em média \pm SEM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ -ANOVA e t test Student.

7.1.3. MEDIÇÃO DIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO E PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Foram avaliados também em nosso estudo os níveis de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois em condições inflamatórias há um aumento

nos níveis de XO e, portanto, um aumento da geração de ROS pelo processo enzimático, resultando em alterações na função vascular (Kayyali et al., 1998). Esta avaliação foi feita por medição direta com macroeletrodo com membrana polimérica permeável a NO e outra permeável a H₂O₂, apresentando uma redução considerável dos níveis de ambos (Figuras 11A e C) em concordância com o fato de que a inibição da xantina oxidase produz uma redução na produção de ânion O₂⁻ e conseqüentemente de H₂O₂, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NO como mostrado por vários pesquisadores previamente (Godber et al., 2000; Margaritis et al., 2011; Millar et al., 2002; Polytarchou and Papadimitriou, 2004). Porém, a administração da mesma dose que causara a redução na produção destes na fase aguda, quando administrada na fase crônica do processo apresentou um incremento estatisticamente significativo quando comparados o grupo tratado com o controle (Figuras 11B e D), apoiando a teoria de um duplo efeito do alopurinol sobre a angiogênese inflamatória e o estresse oxidativo segundo o momento de início do tratamento. Também é possível observar uma redução do nível basal de NO nos implantes de 14 dias o qual pode ser explicado pelo fato de que nesta parte do processo já é atingido o nível máximo de produção deste gás provocando um feedback negativo, entretanto que o nível basal de peróxido de hidrogênio encontra-se elevado sugerindo que pode ter outras fontes além da cascata de produção do ácido úrico. Em geral, é seguro concluir que a redução da produção de superóxido conseqüente da inibição da XO, é benéfica na maioria dos estados fisiopatológicos descritos anteriormente. No entanto, a contribuição relativa da formação de O₂⁻ derivado de XO ainda é desconhecida e pode ser dependente de múltiplos fatores, incluindo as espécies, o tipo de células, o tecido e o tipo de

estágio da doença em particular como demonstrado por pesquisadores anteriores (Berry and Hare, 2004; Brandes and Kreuzer, 2005; Griendling, 2004).

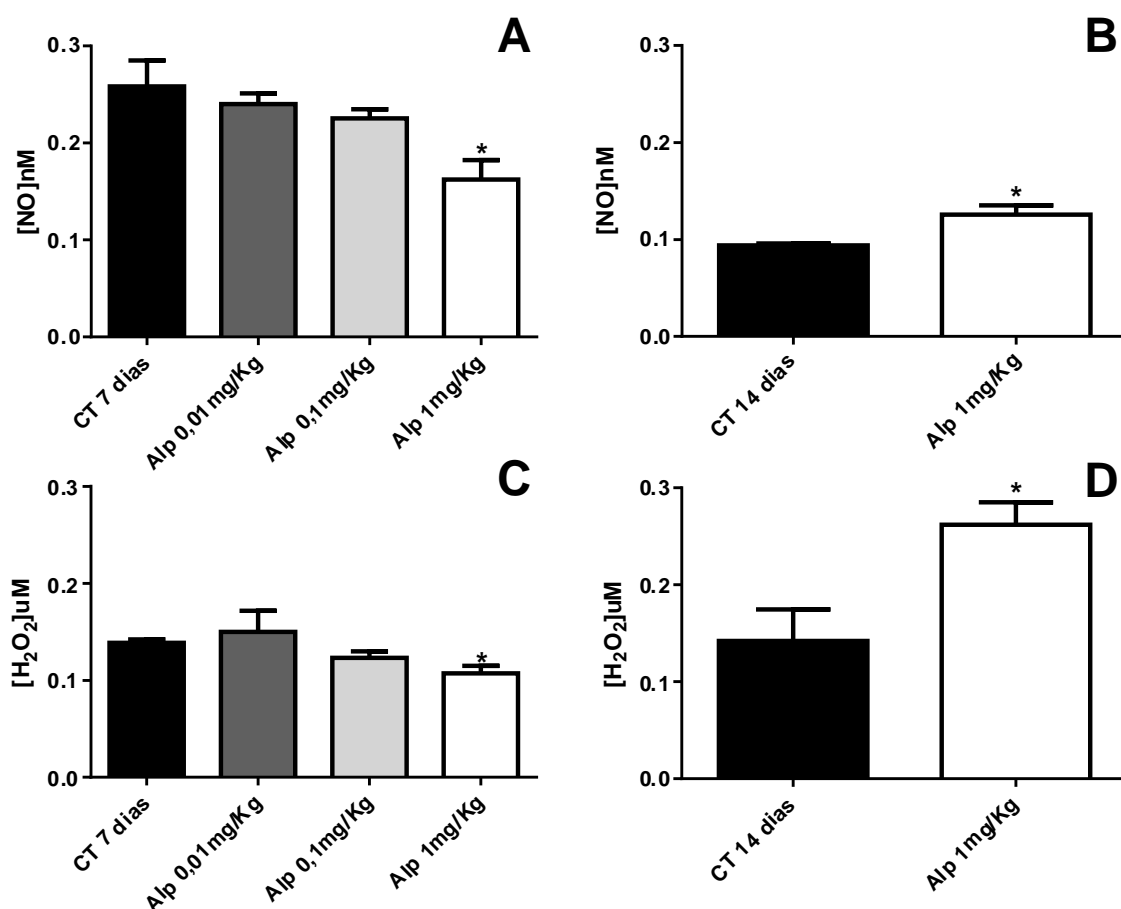


Figura 11- Efeitos do tratamento com alopurinol na geração de NO e H₂O₂ no tecido fibrovascular induzido por uma matriz sintética em camundongos. A produção de NO e H₂O₂ diminuiu quando o tratamento foi iniciado 24 horas após a implantação (A e C), mas aumentou quando o tratamento começou 8 dias após a implantação (D e B). Os valores são expressos em média ± SEM de 5 animais em cada grupo. * p < 0,05-ANOVA e t de Student.

7.1.4. PARÂMETROS FIBROGÊNICOS

Um padrão completamente diferente do efeito do composto foi observado no componente fibrogênico do tecido fibrovascular (níveis de TGF-β1 e deposição de colágeno). Já que quando o tratamento foi iniciado no processo agudo, se produz um aumento em ambos os parâmetros, implicando um efeito positivo sobre o reparo tecidual (Figura 12A e C). Por outro lado, quando o tratamento foi

iniciado durante o processo inflamatório crônico, houve uma diminuição dos níveis de TGF- β 1 e da deposição de colágeno foi detectada (Figura 12B e D).

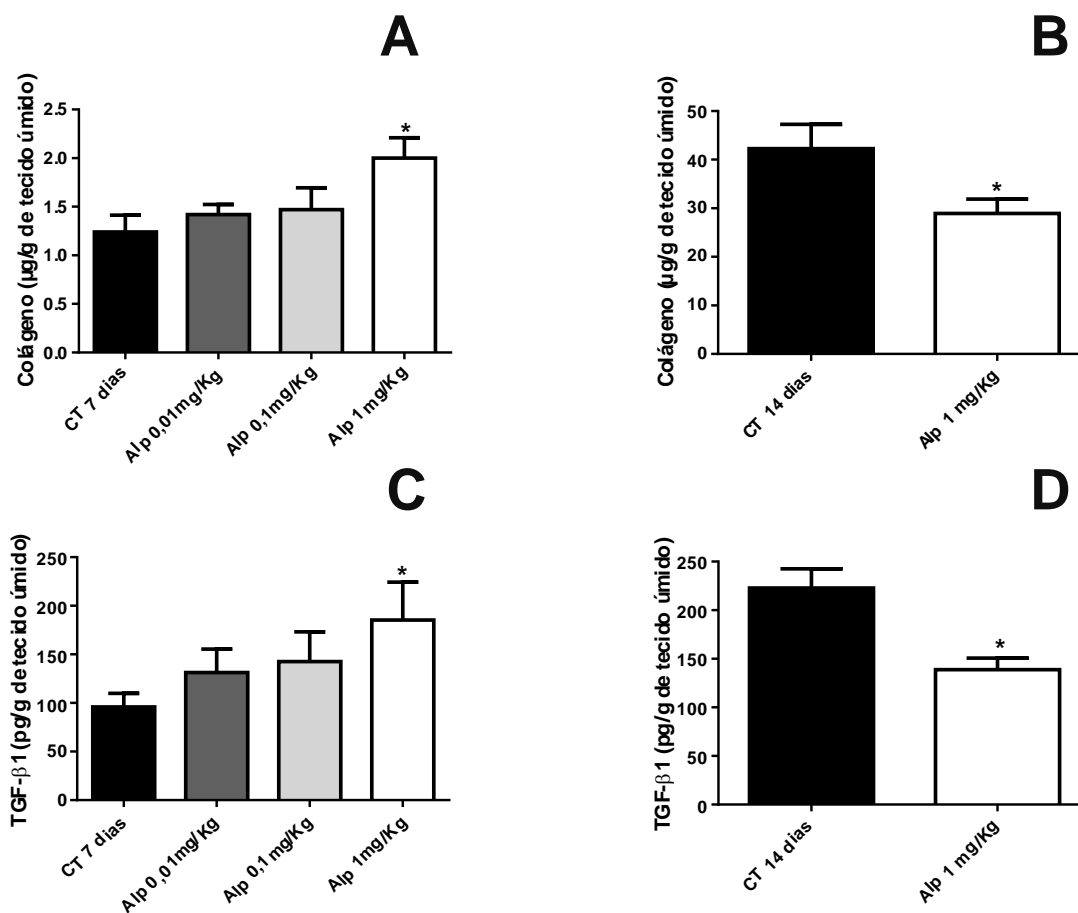


Figura 12- Efeitos do tratamento com alopurinol no componente fibrogênico do tecido fibrovascular induzido por matriz sintética (poliéter-poliuretano). Aumento da deposição de colágeno (A) e produção de TGF- β 1 (C) em implantes de animais tratados 24 h pós-implantação. Em B e D, os componentes fibrogênicas em implantes de animais controle e tratados oito dias pós-implantação. Os valores são expressos em média \pm SEM de 8-11 animais em cada grupo. * $p < 0.05$ – ANOVA e t test Student.

7.1.5. FLUXO SANGUÍNEO CUTÂNEO

Tendo estabelecido que o alopurinol exerce efeitos moduladores nos diferentes componentes (inflamatório, angiogênico e fibrogênico) do tecido fibroproliferativo induzido pelo implante da matriz sintética de esponja, decidimos investigar o efeito do composto sobre a vasculatura e o fluxo sanguíneo cutâneo tanto nos animais que receberam tratamento com o fármaco quanto os pertencentes ao grupo controle. O gráfico abaixo mostra os picos de fluoresceína tanto nos

animais do grupo controle quanto nos animais tratados com uma dose de 1mg/Kg de peso de alopurinol administrada por gavagem. O fluxo sanguíneo cutâneo dos animais tratados foi maior do que aqueles dos animais que receberam só veículo. Esta resposta sugere uma possível vasodilatação sistêmica induzida pela administração do fármaco.

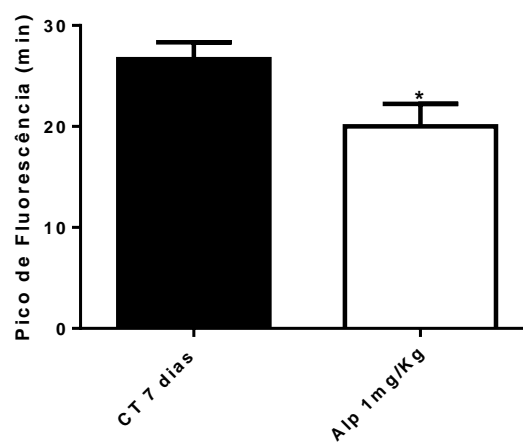


Figura 13- Difusão da Fluorescência (avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo) nos animais com implantes de sete dias. Os valores representam as médias \pm e.p.m de grupos de 6 animais em cada grupo. * $p < 0,05$.

8. DISCUSSÃO

Além de seu efeito clássico reduzindo os níveis de ácido úrico tanto na hiperuricemia primária quanto na secundária, os inibidores da xantina oxidase particularmente o alopurinol, apresentaram vasta gama de ações, incluindo as ações benéficas (principalmente anti-oxidantes e anti-inflamatórias) sobre várias formas de isquemia e outros tipos de lesões vasculares, doenças inflamatórias, e insuficiência cardíaca crônica (Berry and Hare, 2004; Harrison, 2002; Harrison, 2004). Considerando-se que a xantina oxidase regula muitas funções celulares, tais como recrutamento de células inflamatórias e endoteliais, através da produção de espécies reativas de oxigênio (Burton et al., 1995; Grisham et al., 1986; Nielsen et al., 1994; Pesonen et al., 1998; Poggetti et al., 1992; Tan et al., 1995; Terada et al., 1992) testou-se a hipótese de que a administração de um inibidor da enzima xantina oxidase poderia modular os principais componentes do tecido fibrovascular proliferativo induzido pelo implante de uma matriz sintética (poliéter-poliuretano) em camundongos. Este tecido induzido pela implantação da matriz sintética é semelhante ao que se produz após danos mecânicos e que ocorrem naturalmente nos tecidos, como consequência de angioplastia de balão, aterosclerose, e feridas cirúrgicas. Neste tipo de ambiente inflamatório altamente ativado a quantidade de ROS pode contribuir para danos persistentes (Abu-Soud and Hazen, 2000; Alimonda et al., 2009; Grisham et al., 1986). Um tipo semelhante de tecido está associado com um número de parâmetros fisiológicos (reparação de tecidos) e processos patológicos (inflamação crônica, o crescimento do tumor). Os nossos

resultados mostraram que o alopurinol inibiu os componentes inflamatório e angiogênico do tecido fibrovascular recém-formado e modulou de forma positiva o componente fibrogênico, de maneira dose dependente como avaliado através de uma combinação de abordagens funcionais, bioquímicas e histológicas, quando for administrado em uma fase aguda do processo de formação desse tecido (24 h pós implante). Além disso, também mostraram a grande contribuição do composto na modulação da produção de NO e H₂O₂ em um tecido proliferativo recém-formado. Este é o primeiro estudo a demonstrar tais efeitos simultaneamente na angiogênese inflamatória *in vivo* na fase aguda do processo. No entanto, o tratamento quando administrado na fase crônica apresentou efeitos opostos, modulando positivamente, tanto os parâmetros inflamatórios quanto os angiogênicos e negativamente os parâmetros fibrogênicos.

Na formação do tecido fibrovascular proliferativo, a angiogênese e inflamação co-existem e estão associadas com um número de processos fisiológicos e patológicos como já mencionados. A literatura não tem relatos dos efeitos do alopurinol nos eventos biológicos induzidos pelo implante de matriz sintética em fases distintas da formação do tecido fibrovascular proliferativo. O modelo utilizado proporciona um microambiente favorável para o desenvolvimento do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) onde todos seus componentes podem ser determinados (Andrade et al., 1997; Belo et al., 2004; Campos et al., 2006). Neste modelo, pode ser avaliada a modulação de ditos componentes por uma série de compostos com potenciais

terapêuticos (Araujo et al., 2010; Belo et al., 2004; Ferreira et al., 2004; Sampaio et al., 2012).

Primeiramente nós avaliamos a atividade inflamatória induzida pela matriz sintética implantada, esta mensuração foi realizada através da quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase para a estimativa indireta do acúmulo de neutrófilos e de macrófagos, respectivamente, como também pelos níveis intra-implante das citocinas TNF- α e CCL-2. Esta última funciona como agente quimiotático para macrófagos e, níveis aumentados da mesma estão associados com aumento do recrutamento destas células, *in vitro* ou *in vivo* (Rollins, 1997).

O recrutamento seletivo de leucócitos da circulação para o local lesado é um dos marcos da resposta inflamatória (Butcher, 1991), sendo os neutrófilos e posteriormente os macrófagos as primeiras linhagens celulares a se acumularem nos sítios de lesão (Ford et al., 1989). Ambas a enzimas estão presentes com alta atividade específica nos respectivos grânulos azurofílicos de neutrófilos e lisossomos de macrófagos ativados (Bailey, 1988; Kuebler et al., 1996).

Foi mostrado em nosso estudo um efeito modulatório do alopurinol nesses marcadores inflamatórios (atividade de enzimas inflamatórias) no modelo utilizado, apresentando uma diminuição da atividade das duas enzimas dosadas, quando iniciado o tratamento 24 h após o implante, este resultado encontra-se em concordância com os achados de Margaritis e colaboradores (2011) os quais demonstraram que a administração oral de alopurinol (100

mg/Kg) previa a isquemia, reduz a atividade da MPO em um modelo de isquemia/reperfusão intestinal em ratos. A diminuição da atividade da NAG também foi observada por Peto e colaboradores (2005) em um modelo de isquemia/reperfusão renal em cães, quando administrado pré-tratamento com alopurinol antes da oclusão da artéria renal (Peto et al., 2005). Em relação à diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e CCL-2, nossos resultados concordam com relatos da literatura que indicam que a administração pré-operatória de alopurinol (300 mg/Kg/dia por 5 dias) em pacientes submetidos a bypass cardíaco, diminui a inflamação e lesão miocárdica de acordo com parâmetros bioquímicos entre eles a quantificação em soro de TNF- α (Gormus et al., 2013). Já Baldwin e colaboradores em 2011 demonstraram que o ácido úrico in vitro induz um aumento na produção (mRNA e proteína secretada) de CCL-2 (Baldwin et al., 2011). No entanto, a dose de 1 mg/Kg de alopurinol quando iniciado o tratamento 8 dias após o implante produz uma modulação positiva deste parâmetros, não achamos na literatura estudos que avaliaram os mesmos em processos crônicos, sendo assim, nossos resultados da modulação destes parâmetros propõem um efeito pró-inflamatório do composto quando administrado em uma fase crônica do processo de formação do tecido fibrovascular proliferativo.

A investigação da modulação do alopurinol na infiltração vascular dos implantes foi feita pelo método de dosagem de hemoglobina (DRABKIN & AUSTIN, 1932 adaptado por PLUNKETT & HAILEY, 1990) para analisar a atividade angiogênica. Esta dosagem foi utilizada como índice indireto para a avaliação da vascularização nos implantes. O efeito anti-angiogênico do

alopurinol, visto na diminuição do conteúdo de hemoglobina nos implantes de sete dias, pós-administração de 1 dose diária de 1 mg/Kg de alopurinol por 6 dias consecutivos está de acordo com vários relatos que demonstraram a ação inibitória de outros compostos com atividade antioxidante em diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*. Polytarchou & Papadimitriou, em 2004 utilizando o modelo da membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM), mostraram que o superóxido dismutase (SOD) diminuiu a angiogênese dependente da dose *in vivo* (Polytarchou and Papadimitriou, 2004). Já, Kou e colaboradores em 2008 demonstraram que XO endógena tem um papel importante na sobrevivência de células endoteliais em um ensaio *in vitro* (Kou et al., 2008). Mas a modulação do alopurinol na angiogênese inflamatória induzida por um modelo de implante de matriz sintética, não foi investigada previamente a este estudo.

Além disso, também foi avaliado em nosso estudo os níveis intra-implante de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A citocina VEGF atua de maneira autócrina ou parácrina e pode estimular angiogênese agindo diretamente sobre os receptores no endotélio ou indiretamente atraindo e/ou ativando células acessórias (ex. leucócitos) que, por sua vez, irão produzir mais fatores angiogênicos. Além disso, essa citocina pode atuar na indução do crescimento do novo vaso sanguíneo (Liekens et al., 2001).

Em nossos experimentos os níveis de VEGF aumentaram nos implantes tratados com a dose menor (0,01 mg/Kg de peso) de alopurinol e retirados após 7 dias e, diminuíram com a dose maior (1 mg/Kg de peso). Este

resultado está em concordância com trabalhos anteriores (Kou et al., 2008) que mostraram que a XO endógena aumenta os níveis de VEGF.

Contrario aos resultados da fase aguda, os parâmetros angiogênicos foram modulados positivamente na fase crônica, pois os animais do grupo tratado apresentaram níveis intra-implante tanto do conteúdo de hemoglobina quanto de produção de VEGF superiores aos dos implantes dos animais controle (implantes de 14 dias).

Foram avaliados também em nosso estudo os níveis de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois em condições inflamatórias há um aumento nos níveis de XO e, portanto, um aumento da geração de ROS pelo processo enzimático, resultando em alterações na função vascular (Kayyali et al., 1998). Por medição direta com macroeletrodo com membrana polimérica permeável a estes gases (foi utilizado um macroeletrodo específico para cada gás) apresentando uma redução considerável dos níveis de ambos os gases em concordância com o fato de que a inibição da xantina oxidase produz uma redução na produção de ânion O_2^- e consequentemente de H_2O_2 , óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NO como mostrado por vários pesquisadores previamente (Margaritis et al., 2011; Polytarchou and Papadimitriou, 2004).

Além do potencial vasodilatador, o NO é reconhecido como um mediador e regulador de respostas inflamatórias. Além de ter propriedades citotóxicas que podem agir contra agentes patogênicos, mas também pode ter efeitos nocivos sobre os tecidos do hospedeiro. A interação do NO com o oxigênio

molecular e ânion O_2^- produz espécies reativas de nitrogênio que podem modificar várias funções celulares. Estes efeitos indiretos do NO desempenham um papel importante na inflamação. Porém, a administração da mesma dose que causara a redução na produção destes gases (1 mg/Kg de peso) quando administrada na fase crônica do processo apresentou um incremento estatisticamente significativo quando comparado o grupo tratado com o controle, apoiando a teoria de um duplo efeito do alopurinol sobre a angiogênese inflamatória e o estresse oxidativo segundo o momento de início do tratamento.

Evidências diretas do mecanismo pelo qual o alopurinol atenuou a angiogênese inflamatória no implante de matriz sintética não foram investigadas em nosso estudo.

Já nos parâmetros fibrogênicos, observamos uma modulação positiva do composto sobre os mesmos quando o tratamento foi administrado durante a fase aguda (24 h após implantação). Não encontramos na literatura qualquer estudo que tenha avaliado o efeito do composto na fibrogênese em processos agudos. Com base neste resultado é possível sugerir a utilização deste fármaco como tratamento co-adjuvante no tratamento de processos cicatriciais deficientes. No entanto, quando o tratamento foi iniciado durante a fase crônica houve uma diminuição nos níveis de colágeno e de TGF- β 1 estes achados encontram-se em concordância com estudos previamente publicados, nos quais a administração de alopurinol produz uma diminuição dos níveis de TGF- β e na ativação de NF- κ B em condições patológicas

crônicas como a cirrose experimental induzida por tratamento crônico (8 semanas) com tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos (Aldaba-Muruato et al., 2013). Uma possível explicação para esta discrepância entre os efeitos do alopurinol na modulação da fibrose pode ser atribuída a administração do inibidor nas diferentes fases do processo inflamatório.

Após determinarmos a modulação do alopurinol nos vários componentes do tecido fibrovascular recém formado nos grupos tratados e controle, foi avaliada a possibilidade de uma ação sistêmica do fármaco. A avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo utilizando o método de difusão da fluoresceína sódica, mostrou que nos animais tratados com 1 mg/Kg de peso de alopurinol e aqueles que só receberam o veículo, o pico de fluorescência ocorria mais tardiamente nestes últimos em relação com os animais tratados. Estes resultados indicam um efeito vasodilatador cutâneo associado à administração do composto. Não encontramos na literatura qualquer relato de efeito vasodilatador do alopurinol na pele. Porém, é plausível especular um possível mecanismo de ação para este efeito com base na modulação de mediadores vasodilatadores (NO e H₂O₂).

Os resultados desta investigação mostraram que o alopurinol modula de forma antagônica os diferentes componentes da angiogênese inflamatória dependendo da fase de início do tratamento (aguda ou crônica). Em conclusão, os efeitos inibitórios ou estimuladores do alopurinol sobre os componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido fibrovascular foram dependentes da fase do início do tratamento. Estes achados ampliam o

potencial terapêutico do fármaco no controle de doenças fibroproliferativas e no tratamento co-adjuvante na cicatrização de lesões.

9. CONCLUSÃO

Os efeitos do alopurinol inibindo ou estimulando, vários parâmetros dos principais componentes da angiogênese inflamatória induzida pelo nosso modelo de implante de matriz sintética estão associados a regulação de citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas, além da modulação da produção de NO e H₂O₂ dependem da fase do início do tratamento.

Nossos resultados confirmam e ampliam as ações antiinflamatórias e antiangiogênicas do Alopurinol observada em outros sistemas. Além de sugerir novos potenciais terapêuticos do alopurinol para controle da angiogênese inflamatória em doenças fibroproliferativas e cicatrização deficiente de lesões.

10. REFERÊNCIAS

- Abu-Soud, H. M., Hazen, S. L., 2000. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 275, 5425-30.
- Albini, A., et al., 2005. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 65, 10637-41.
- Aldaba-Muruato, L. R., et al., 2013. Allopurinol reverses liver damage induced by chronic carbon tetrachloride treatment by decreasing oxidative stress, TGF-beta production and NF-kappaB nuclear translocation. *Pharmacology.* 92, 138-49.
- Alimonda, A. L., et al., 2009. Hyperuricemia in acute heart failure. More than a simple spectator? *Eur J Intern Med.* 20, 74-9.
- Almeida, S. A., et al., 2014. Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 41, 691-7.
- Andrade, S. P., et al., 1987. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol.* 68, 755-66.
- Andrade, S. P., Ferreira, M. A., 2009. The sponge implant model of angiogenesis. *Methods Mol Biol.* 467, 295-304.
- Andrade, S. P., et al., 1997. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res.* 54, 253-61.
- Araujo, F. A., et al., 2011. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 38, 262-8.

- Araujo, F. A., et al., 2010. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. *Biomed Pharmacother.* 64, 29-34.
- Arenberg, D. A., et al., 1997a. The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol.* 62, 554-62.
- Arenberg, D. A., et al., 1997b. In vitro and in vivo systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol.* 288, 190-220.
- Aronson, J. K., 2007. Old drugs--new uses. *Br J Clin Pharmacol.* 64, 563-5.
- Ashburn, T. T., Thor, K. B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 3, 673-83.
- Aslan, M., et al., 2001. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 15215-20.
- Bailey, P. J., 1988. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162, 327-34.
- Baldwin, W., et al., 2011. Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 60, 1258-69.
- Barcelos, L. S., et al., 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol.* 78, 352-8.
- Belo, A. V., et al., 2004. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci.* 74, 2827-37.
- Belo, A. V., et al., 2001. Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. *Inflammation.* 25, 91-6.

- Benelli, R., et al., 2006. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr Pharm Des.* 12, 3101-15.
- Bernardini, G., et al., 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.* 273, 83-101.
- Berry, C. E., Hare, J. M., 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 555, 589-606.
- Bieber, J. D., Terkeltaub, R. A., 2004. Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum.* 50, 2400-14.
- Borish, L. C., Steinke, J. W., 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 111, S460-75.
- Bradshaw, A. D., et al., 2001. Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair Regen.* 9, 522-30.
- Brandes, R. P., Kreuzer, J., 2005. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 65, 16-27.
- Broeders, M. A., et al., 1998. Endogenous nitric oxide protects against thromboembolism in venules but not in arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 139-45.
- Burton, L. K., et al., 1995. Xanthine oxidase contributes to lung leak in rats subjected to skin burn. *Inflammation.* 19, 31-8.
- Butcher, E. C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 67, 1033-6.

- Campos, P. P., et al., 2006. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol.* 21, 1263-70.
- Campos, P. P., et al., 2008. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen.* 16, 416-24.
- Chang, C., Werb, Z., 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11, S37-43.
- Charo, I. F., Ransohoff, R. M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354, 610-21.
- Charo, I. F., Taubman, M. B., 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 95, 858-66.
- Chidlow, J. H., Jr., et al., 2010. VEGF(1)(6)(4) differentially regulates neutrophil and T cell adhesion through ItgaL- and ItgaM-dependent mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299, G1361-7.
- Coussens, L. M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420, 860-7.
- D'Amore, P. A., Thompson, R. W., 1987. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 49, 453-64.
- de Oliveira, T. B., et al., 2007. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol.* 116, 357-63.
- de Souza, C. M., et al., 2014. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother.* 68, 51-7.
- Doehner, W., et al., 2002. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients

- with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation*. 105, 2619-24.
- Dvorak, H. F., 2005. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*. 3, 1835-42.
- Fernandez, M. L., et al., 2012. Elevated uric acid correlates with wound severity. *Int Wound J*. 9, 139-49.
- Fernandez, M. L., et al., 2014. Uric acid and xanthine oxidoreductase in wound healing. *Curr Rheumatol Rep*. 16, 396.
- Ferreira, M. A., et al., 2004. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol*. 141, 1185-92.
- Folkman, J., Greenspan, H. P., 1975. Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim Biophys Acta*. 417, 211-36.
- Folkman, J., Klagsbrun, M., 1987. Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*. 329, 671-2.
- Ford, C. W., et al., 1989. Establishment of an experimental model of a *Staphylococcus aureus* abscess in mice by use of dextran and gelatin microcarriers. *J Med Microbiol*. 28, 259-66.
- Freedman, J. E., 2008. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28, s11-6.
- George, J., Struthers, A. D., 2009. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular health and risk management*. 5, 265-72.
- Giler, S., et al., 1977. Elevation of serum xanthine oxidase activity following halothane anesthesia in man. *Experientia*. 33, 1356-8.

- Giler, S., et al., 1976. Elevated serum xanthine oxidase activity following biliary tract and gastric surgery. *Int Surg.* 61, 153-5.
- Glantzounis, G. K., et al., 2005. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 11, 4145-51.
- Godber, B. L., et al., 2000. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* 275, 7757-63.
- Gormus, Z. I., et al., 2013. Does preoperative administration of allopurinol protect the lungs from ischemia-reperfusion injury occurring during cardiopulmonary bypass? *Bratisl Lek Listy.* 114, 561-5.
- Granger, D. N., Senchenkova, E., 2010.
- Greenhalgh, D. G., 1996. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma.* 41, 159-67.
- Grell, M., et al., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 83, 793-802.
- Griendling, K. K., 2004. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart.* 90, 491-3.
- Grisham, M. B., et al., 1986. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 251, G567-74.
- Gupta, S., 2002. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol.* 22, 185-94.
- Gupta, S. C., et al., 2013. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci.* 34, 508-17.
- Guthikonda, S., et al., 2003. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation.* 107, 416-21.

- Harrison, R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 33, 774-97.
- Harrison, R., 2004. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev.* 36, 363-75.
- Hestin, D., Johns, E. J., 1999. The influence of allopurinol on kidney haemodynamic and excretory responses to renal ischaemia in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 128, 255-61.
- Hicklin, D. J., Ellis, L. M., 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 23, 1011-27.
- Houston, M., et al., 1999. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem.* 274, 4985-94.
- Kayyali, R., et al., 1998. Comparative radical scavenging ability of bidentate iron (III) chelators. *Biochem Pharmacol.* 55, 1327-32.
- Kelley, E. E., et al., 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free radical biology & medicine.* 48, 493-8.
- Kida, M., Lenz, W., 1968. [Thalidomide embryopathy in Japan]. *Arch Kinderheilkd.* 177, 244-59.
- Kou, B., et al., 2008. Xanthine oxidase interaction with vascular endothelial growth factor in human endothelial cell angiogenesis. *Microcirculation.* 15, 251-67.
- Koutroubakis, I. E., et al., 2006. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 12, 515-23.

- Kuebler, W. M., et al., 1996. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp.* 16, 89-97.
- Kumar, V., et al., 2008. Effect of clarithromycin on lung inflammation and alveolar macrophage function in *Klebsiella pneumoniae* B5055-induced acute lung infection in BALB/c mice. *J Chemother.* 20, 609-14.
- Kuppahally, S., et al., 2006. Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. *Am J Transplant.* 6, 986-92.
- Lenz, W., 1966. Malformations caused by drugs in pregnancy. *Am J Dis Child.* 112, 99-106.
- Liekens, S., et al., 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 61, 253-70.
- Linas, S. L., et al., 1990. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol.* 258, F711-6.
- Maeshima, Y., et al., 2000. Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem.* 275, 23745-50.
- Malik, U. Z., et al., 2011. Febuxostat inhibition of endothelial-bound XO: implications for targeting vascular ROS production. *Free radical biology & medicine.* 51, 179-84.
- Manning, A. S., et al., 1984. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res.* 55, 545-8.

- Mantovani, A., et al., 1997. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 832, 93-116.
- Margaritis, E. V., et al., 2011. Effects of oral administration of (L)-arginine, (L)-NAME and allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci.* 88, 1070-6.
- Marques, S. M., et al., 2011. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res.* 82, 246-52.
- Matthews, S. J., McCoy, C., 2003. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther.* 25, 342-95.
- McManaman, J. L., et al., 1999. Mouse mammary gland xanthine oxidoreductase: purification, characterization, and regulation. *Arch Biochem Biophys.* 371, 308-16.
- Mendes, J. B., et al., 2009. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc Res.* 78, 265-71.
- Mignatti, P., Rifkin, D. B., 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein.* 49, 117-37.
- Millar, T. M., et al., 2002. Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Rep.* 7, 65-70.
- Moses, M. A., 1997. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 15, 180-9.
- Moura, S. A., et al., 2011. Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. *J Pharm Sci.* 100, 2886-95.

- Mrowietz, U., Boehncke, W. H., 2006. Leukocyte adhesion: a suitable target for anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des.* 12, 2825-31.
- Murphy, G., et al., 1999. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 878, 25-39.
- Murphy, K. E., et al., 2011. A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor beta and tissue tension in dermal wound healing. *J Theor Biol.* 272, 145-59.
- Nagy, V., et al., 2008. Thrombophilic screening in retinal artery occlusion patients. *Clin Ophthalmol.* 2, 557-61.
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* 420, 846-52.
- Nielsen, V. G., et al., 1994. Xanthine oxidoreductase release after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 107, 1222-7.
- Nunes, P. S., et al., 2011. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 761593.
- O'Reilly, M. S., et al., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 88, 277-85.
- Otrock, Z. K., et al., 2007. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis.* 39, 212-20.
- Oviedo-Socarras, T., et al., 2014. Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvasc Res.* 93, 23-9.

- Pacher, P., et al., 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 58, 87-114.
- Pea, F., 2005. Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol.* 147, 35-46.
- Pereira, F. O., et al., 2006. Evaluation of tumour necrosis factor alpha, interleukin-2 soluble receptor, nitric oxide metabolites, and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2006, 39062.
- Pesonen, E. J., et al., 1998. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology.* 114, 1009-15.
- Peto, K., et al., 2005. [Determination of urinary NAG to detect renal ischemia-reperfusion injury and the protective effect of Allopurinol]. *Magy Seb.* 58, 134-7.
- Peuckmann, V., et al., 2003. [Novel potential uses of thalidomide in the management of pain? A review of the literature]. *Schmerz.* 17, 204-10.
- Phillips, R. J., et al., 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest.* 114, 438-46.
- Poggetti, R. S., et al., 1992. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma.* 32, 723-7; discussion 727-8.
- Polytarchou, C., Papadimitriou, E., 2004. Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Free Radic Res.* 38, 501-8.
- Prakash, S., Robbins, P. W., 2001. Fibrosin: a novel lymphokine in wound healing. *Exp Mol Pathol.* 71, 247-55.

- Puig, J. G., Martinez, M. A., 2008. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 20, 187-91.
- Rhoden, E., et al., 2000. The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Eur Surg Res.* 32, 215-22.
- Rollins, B. J., 1997. Chemokines. *Blood.* 90, 909-28.
- Rott, K. T., Agudelo, C. A., 2003. Gout. *JAMA.* 289, 2857-60.
- Saban-Ruiz, J., et al., 2013. Xanthine oxidase inhibitor febuxostat as a novel agent postulated to act against vascular inflammation. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 12, 94-9.
- Sampaio, F. P., et al., 2012. Genetic background determines inflammatory angiogenesis response to dipyridamole in mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 237, 1084-92.
- Savvatis, K., et al., 2010. Kinins in cardiac inflammation and regeneration: insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy. *Neuropeptides.* 44, 119-25.
- Schlesinger, N., 2004. Management of acute and chronic gouty arthritis: present state-of-the-art. *Drugs.* 64, 2399-416.
- Sedgwick, J. B., et al., 2002. Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. *J Allergy Clin Immunol.* 110, 752-6.
- Sherry, B., Cerami, A., 1988. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol.* 107, 1269-77.

- Slevin, M., et al., 2009. Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: possible targets for therapeutic intervention. *J Angiogenes Res.* 1, 4.
- Tan, C. M., et al., 1995. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res.* 77, 710-7.
- Tan, S., et al., 1998. Endothelial injury from a circulating mediator following rat liver ischemia. *Free Radic Biol Med.* 24, 427-34.
- Tan, S., et al., 1993. Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med.* 15, 407-14.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., 1992. Two TNF receptors. *Immunol Today.* 13, 151-3.
- Terada, L. S., et al., 1992. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 263, L394-401.
- Terkeltaub, R. A., 2003. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med.* 349, 1647-55.
- Thuraisingam, T., et al., 2010. MAPKAPK-2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 130, 278-86.
- Tracey, K. J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature.* 420, 853-9.
- Ushio-Fukai, M., Urao, N., 2009. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal.* 11, 2517-33.
- Vianna, F. S., et al., 2013. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide.* 35, 89-92.
- Visser, L., et al., 2006. Phagocytes containing a disease-promoting Toll-like receptor/Nod ligand are present in the brain during demyelinating disease in primates. *Am J Pathol.* 169, 1671-85.

- White, C. R., et al., 1996. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 8745-9.
- Wortmann, R. L., 2005. Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol.* 17, 319-24.
- Wright, H. L., et al., 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 49, 1618-31.
- Xavier, D. O., et al., 2010. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother.* 64, 220-5.
- Yokoyama, Y., et al., 1990. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol.* 258, G564-70.
- Zima, T., et al., 1993. Plasma xanthine oxidase level and alcohol administration. *Alcohol Alcohol.* 28, 693-4.