



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
DA GIROXINA (ENZIMA TROMBINA SÍMILE) DO VENENO
DA CASCAVEL BRASILEIRA, *Crotalus durissus terrificus***

JOSÉ ALBERTO ALVES DA SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

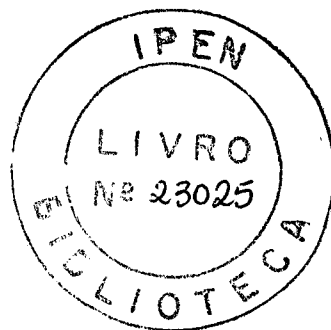
Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Pires Camillo

**São Paulo
2004**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ASPECTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DA GIROXINA (ENZIMA TROMBINA
SÍMILE) ISOLADA DO VENENO DA CASCAVEL BRASILEIRA, *Crotalus
durissus terrificus***

JOSÉ ALBERTO ALVES DA SILVA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

**Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Pires Camillo**

SÃO PAULO

2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lindinalva e José Alves que estão sempre presente nos momentos mais difíceis.

À minha Orientadora Doutora Maria Aparecida Pires Camillo pela confiança e paciência.

Ao Doutor José Roberto Rogero por todo apoio e confiança desde a iniciação científica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Doutora Nanci do Nascimento por ter me "acolhido" nesta instituição.

Ao Senhor Doutor Patrick Jack Spencer por toda ajuda e incentivo.

À Dra. Olga por todas as dicas e ajuda em várias etapas desse trabalho.

Ao Dr. Cristóforo Scavone e Msc. Elisa Mitiko Kawamoto do Departamento de Farmacologia – ICB - USP pelo auxílio nos ensaios com NOS.

Ao Dr. Benedito Carlos Prezoto por sua valiosa colaboração.

À Dra. Emiko Murato do Centro de Radiofarmácia – IPEN pelo auxílio no ensaio de biodistribuição.

À Dra. Maria Tereza C.P. Ribela pelo auxílio na radioiodação.

Ao Dr. Daniel Pimenta, do Instituto Butantan, por ter me ajudado com as análises de espectrometria de massa.

À minha irmã Luciana Alves, meu primeiro incentivo.

Ao meu irmão Joab Alves, Mestre em encarar suas dificuldades de uma forma extraordinariamente divertida... gostaria muito de ter parte de sua força.

Ao Doutor Paulo Sérgio Cardoso da Silva por todo apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos Daniel Perez e Andrés do Instituto de Medicina Tropical que pouco ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos, Janaina (Super Simpática), Lucélia (Dissimulada), Murilo (Químico Ocioso), Renan (Oráculo), Natália Malavasi (Senhora Joacyr), Leonardo (Mala) e Helena Costa do Grupo de Venenos do IPEN por toda amizade e, principalmente, pela paciência durante esse tempo.

Aos "irmãozinhos Japas" Willian Sato, Juliana Lully e Camila Yonamine que muito ajudaram nas etapas finais desse trabalho.

Aos amigos Álvaro Júnior, Marlon Melo e Glaciene Tomás, que saudade.

Ao amigo Eduardo Greco por suas frases inspiradoras "Você nunca vai conseguir Alberto!".

ASPECTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DA GIROXINA (ENZIMA TROMBINA SÍMILE) ISOLADA DO VENENO DA CASCAVEL BRASILEIRA, *Crotalus durissus terrificus*

JOSÉ ALBERTO ALVES DA SILVA

RESUMO

A giroxina é uma enzima trombina símile isolada do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*. Estas enzimas são largamente encontradas no veneno de serpentes da subfamília Crotalinae. A giroxina parece ser uma enzima multifuncional, pois induz comportamento neurotóxico, atua na coagulação e na pressão arterial.

Para isolar a giroxina foram utilizados métodos de cromatografia de afinidade e gel filtração. Foram feitos ensaios de caracterização *in vitro* e *in vivo* nos quais pôde-se comprovar sua atividade biológica.

Neste trabalho foi determinada a massa molecular, a atividade hipotensiva, a biodistribuição, a atividade da óxido nítrico síntase (NOS) em células endoteliais após tratamento com giroxina e a atividade biológica frente aos inibidores da NOS.

Nos ensaios de atividade biológica verificou-se que a giroxina promove uma queda na pressão arterial de ratos. Com os ensaios nas células endoteliais determinou-se que o óxido nítrico pode ser a molécula efetora nesta atividade. Observou-se, também, que a via óxido nítrico não é via principal da atividade neurotóxica da giroxina. Os ensaios de biodistribuição permitiram observar que a giroxina tem metabolismo hepático, eliminação renal e que não atravessa a barreira hematoencefálica de modo significativo.

**BIOLOGICAL ACTIVITY FEATURES OF GYROXIN (THROMBIN LIKE ENZYME)
ISOLATED FROM *Crotalus durissus terrificus* VENOM**

JOSÉ ALBERTO ALVES DA SILVA

ABSTRACT

Gyroxin is a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. Gyroxin is a multifunctional enzyme showing neurotoxic, fibrinogenolytic activities and decrease in the mean blood pressure (MAP). The gyroxin was isolated by affinity chromatography and gel filtration. Characterization assays were also made, *in vitro* and *in vivo* to verify gyroxin's biological activities. In this work, gyroxin's molecular mass was determined. Hypotension activity, biodistribution, gyroxin-induced NOS activity in ECV 304 cells and biological activity after NOS inhibitor treatment was also studied.

Gyroxin promotes hypotension in rats. The nitric oxide could be the effective molecule in gyroxin-induced hypotension but probably isn't the main pathway in gyroxin neurotoxic activity. Biodistribution data showed that gyroxin has renal and hepatic metabolites. Gyroxin did not pass blood-brain barrier significantly.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl ₂	Cloreto de cálcio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EGTA	Etileno glicol – bis (β-aminoetil éter)
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfônico
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina denucleotídeo
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Tampão salina fosfato
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
SAB	Soro albumina bovina
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TAME	N-alfa-tosil-arginina metil éster
TEMED	N,N,N',N', tetrametil 1,2 diamino
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U.I.	Unidade Internacional
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Obtenção da gioxina	13
3.1.1. Cromatografia em coluna de afinidade	13
3.1.2. Cromatografia em gel filtração	14
3.1.3. Concentração protéica	14
3.2. Ensaio de caracterização	15
3.2.1. Atividade Esterásica	15
3.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	16
3.2.3. Análise em espectrometria de massa	17
3.2.4. Atividade coagulante	18
3.2.5. Neurotoxicidade	18
3.2.6. Efeito na pressão arterial de ratos anestesiados	19
3.2.7. Efeito em células endoteliais em cultura	19
3.2.7.a Determinação da atividade da Óxido Nítrico Síntase	21
3.2.8. Ensaio <i>in vivo</i> com inibidores da NOS	23
3.2.9. Estudo da biodistribuição	24
3.2.9.a. Radioiodação da gioxina	24
3.2.9.b. Biodistribuição	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Obtenção da gioxina	28
4.1.2. Cromatografia em gel filtração	28
4.1.3. Concentração protéica	28
4.2. Ensaio de caracterização	31
4.2.1. Atividade Esterásica	31
4.2.2. Análise em eletroforese em gel de poliacrilamida	31
4.2.3. Análise em espectrometria de massa	34
4.2.4. Atividade coagulante	34
4.2.5. Neurotoxicidade	36
4.2.6. Efeitos na pressão arterial de ratos anestesiados	37
4.2.7. Efeito em células endoteliais em cultura	37
4.2.8. Determinação da atividade da Óxido Nítrico Sintase	37
4.2.9. Ensaio <i>in vivo</i> com inibidores da NOS	41
4.3. Estudo de biodistribuição	41
4.3.1. Radioiodação da gioxina	41
4.3.2. Biodistribuição da [125I]gioxina	43
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Os venenos animais consistem, geralmente, de uma mistura complexa de diversas biomoléculas como proteínas, aminas biogênicas e peptídeos com diferentes atividades; incluem neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento, lectinas, desintegrinas, peptídeos vasoativos, enzimas, inibidores enzimáticos entre outros (MATSUI *et al.*, 2000). A atividade biológica de cada componente é característica e irá definir sua importância no quadro clínico do envenenamento.

No Brasil, os envenenamentos acontecem com serpentes do gênero *Bothrops* (73,1%) *Crotalus* (6,2%) *Lachesis* (1,1%) e *Micrurus* (0,3 %). As ocorrências com *Crotalus* geralmente são as mais sérias com 1,87% de letalidade (FUNASA, 2001).

Nas regiões sudeste e sul a espécie mais comum do gênero *Crotalus* é a *Crotalus durissus terrificus*. O seu veneno pode ser crotamina positivo, neste caso é composto por 60% de crotaxina e 12% de crotamina e, em menor porcentagem, giroxina, deltatoxina, convulxina e outros componentes.

O objeto de estudo deste trabalho foi a giroxina. Esta proteína parece ser multifuncional, induzindo um comportamento neurotóxico, atuando na coagulação e na pressão arterial.

A giroxina foi descrita por BARRIO (1961) e mais tarde isolada por BARRABIN *et al.* (1978). Esta toxina se caracteriza por induzir alterações de equilíbrio típicas de fenômenos motores. Após uma breve fase de contrações musculares, o animal apresenta diversos sintomas e, finalmente, um giro ao longo do eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril (daí o nome "rolamento em barril").

Alguns autores sugerem que o rolamento em barril possa ser uma ferramenta importante para investigar o sistema de neurotransmissão no controle dos neurônios vestibulares que convertem as informações para o núcleo ocular, cerebelo e corda espinal para manter o equilíbrio corporal e a postura (KOSAKO *et al.*, 2000). O rolamento em barril pode servir também como um modelo experimental das desordens do movimento humano (KAWACHI *et al.*, 1998).

A gioxina também é conhecida por sua atividade enzimática trombina símile, atuando sobre o fibrinogênio humano, clivando o fibrinopeptídeo A da cadeia α próximo ao N-terminal (RAW *et al.*, 1986). Os monômeros de fibrina resultantes polimerizam-se em uma rede anormal que difere da produzida pela trombina. Esta rede anormal é instável e mais susceptível à ação de agentes fibrinolíticos (MARKLAND, 1998; KOH *et al.*, 2001). A incoagulabilidade sangüínea parcial ou total observada em casos graves de pacientes picados, pode ser decorrente do consumo do fibrinogênio (BUCARETCHI *et al.*, 2002).

RAW *et al.* (1986) determinaram, por análise em eletroforese, que a gioxina é uma proteína de cadeia única, com massa molecular estimada em 34 kDa.

As enzimas trombina símile possuem algumas propriedades físico-químicas em comum: são glicoproteínas, com cadeia única e massa molecular calculada entre 28 e 60 kDa, são ativas em substratos sintéticos específicos de trombina e compartilham similaridades mecânicas com a trombina (CASTRO *et al.*, 2001), porém apresentam diferenças na clivagem das ligações peptídicas e nas atividades sobre os fatores da coagulação e plaquetas (KORNALIK, 1990; OUYANG *et al.*, 1992).

Há uma variação considerável do conteúdo glicosilado entre as diferentes enzimas trombina símile, o que poderia explicar a diferença de massa entre elas (MARKLAND, 1998).

A giroxina pertence ao grupo das enzimas trombina símile e a um grupo maior conhecido como serino proteases. Estas enzimas são largamente encontradas em veneno de serpentes da subfamília Crotalinae (SCHVARTSMAN, 1992), tendo ação pró-coagulante (MATSUI *et al.*, 2000). Podem ser classificadas em famílias de acordo com suas similaridades nas seqüências de aminoácidos sendo então reunidas em clãs, quando consideradas provindas de um ancestral comum (RAWLINGS *et al.*, 2004). Estas toxinas podem agir em um ou mais fatores da coagulação (ANDREWS *et al.*, 2004).

O especial interesse pela atividade sobre o fibrinogênio deve-se à possibilidade de utilização destas enzimas no tratamento de doenças trombóticas e como anticoagulante. Do ponto de vista clínico, estas enzimas provaram ser úteis na dissolução de coágulos formados, por exemplo, durante infarto do miocárdio, trombozes em veias profundas, pancadas e embolia pulmonar (MARKLAND, 1998).

Na TABELA 1 estão relacionadas as enzimas trombina símile isoladas dos venenos de serpentes com os seus respectivos substratos. Todas elas já tiveram sua seqüência de aminoácidos determinada (<http://www.ebi.ac.uk>) porém, existem muitas outras que ainda não estão estruturalmente caracterizadas. Estas enzimas diferem da trombina por vários fatores como, por exemplo, clivam preferencialmente o fibrinopeptídeo das cadeias A α ou B β do fibrinogênio, e não ativam o fator XIII da coagulação (SELISTRE & GIGLIO, 1987), com exceção da gabonase (PIRKLE *et al.*, 1986). Mesmo com todas as suas similaridades

TABELA 1. Relação de algumas serino proteases isoladas de veneno de serpentes com atividade trombina símile. Entre parênteses, a espécie da qual as enzimas foram obtidas. Na coluna à direita são apresentados os substratos da atividade enzimática (entre colchetes fibrinopeptídeo liberado em menor velocidade).

Enzimas trombina símile	Substratos
Ancrod (<i>Calloselasma rhodostoma</i>)	Fibrinogênio (A, [B]), fator XII
Batroxobin (<i>Botrops atrox moojeni</i>)	Fibrinogênio (A, [B]), fator XII?
Bilineobin (<i>A. binlineatus</i>)	Fibrinogênio (B, [A])
Bothrobin (<i>B. jararaca</i>)	Fibrinogênio (A), fator VIII?
Calobin (<i>C. atrox</i>)	Fibrinogênio (A, [B])
Crotalase (<i>C. Adamanteus</i>)	Fibrinogênio (A, [B])
Flavoxobin (<i>Trimeresurus flavoviridis</i>)	Fibrinogênio (A)
Giroxina símile (<i>Lachesis muta muta</i>)	Fibrinogênio (A, [B])
TM-VIG (<i>T. Mucrosquamatas</i>)	Fibrinogênio (A)
Gabonase (<i>Bitis Gabonica</i>)	Fibrinogênio (A, B), fator XIII

Modificada de MATSUI *et al.* (2000).

seqüenciais algumas diferenças sutis na estrutura dessas toxinas determinam as mais variadas atividades, o que faz com que uma mesma toxina tenha atividade trombina símile, calicreína símile e até degradadora de angiotensina (HUNG & CHIOU, 2001; MARKLAND & DAMUS, 1971; MARKLAND *et al.*, 1982; ESNOUF & TUNNAH, 1967; HATTON, 1973; MATSUI *et al.*, 2000).

MATSUI *et al.* (2000) propõem a classificação destas enzimas baseando-se em suas propriedades.

A atividade calicreína símile foi descrita para algumas destas enzimas, e segundo HUNG & CHIOU (2001), este efeito é especialmente intrigante pois algumas α -fibrinogenases como ancrod não apresentam alta especificidade por cininogênio de alta massa molecular. O mesmo ocorrendo para algumas β -fibrinogenases, cuja atividade enzimática libera bradicinina promovendo uma diminuição da pressão arterial.

Outro mediador importante envolvido na queda da pressão arterial é o óxido nítrico. Este foi originalmente descrito como fator relaxante derivado do endotélio e mais tarde verificou-se que este efeito poderia ser explicado quantitativamente pela formação de óxido nítrico pelas células endoteliais.

O papel do óxido nítrico como molécula vasodilatadora vem sendo descrito há quase duas décadas (IGNARRO, 1987; MONCADA, 1991; XU & KRUKOFF, 2004).

O óxido nítrico difundiu-se pelas células endoteliais onde ele ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sCG), que aumenta a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc ativa a proteína quinase (PK) que fosforila e inativa a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK) interrompendo assim o processo de contração, causando relaxamento do músculo liso vascular em

oposição ao aumento no número de íons Ca^{2+} induzidos por agonistas (FIGURA 1).

As enzimas óxido nítrico sintase (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese de óxido nítrico (FIGURA 2). Três isoformas de NOS foram caracterizadas, e sabe-se que são codificadas por três genes diferentes podendo ser classificadas em duas famílias: as NOS constitutivas (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS). As NOS constitutivas, que são dependentes de cálcio, podem ser neuronais (n-NOS) e endoteliais (e-NOS). Estas isoformas produzem pequenas quantidades de óxido nítrico por um curto período de tempo (minutos a segundos) desempenhando funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A i-NOS pode produzir óxido nítrico por longos períodos de tempo (horas a dias) após sua expressão e é independente de cálcio.

Todas as isoformas podem ser inibidas por análogos da L-arginina, com substituições no grupamento guanidina. Alguns inibidores exibem certa seletividade para determinada isoforma, geralmente por isoformas constitutivas, como por exemplo a L-NAME (N^w -nitro-L-arginina metil ester) que apresenta seletividade por e-NOS. Outro inibidor muito utilizado é o 7-nitroindazol (7-Ni). Este é um composto heterocíclico capaz de inibir a n-NOS, por um mecanismo que parece envolver sua ligação ao grupamento heme da NOS (TEIXEIRA, 2001).

O óxido nítrico é uma molécula ativa em vários sistemas, pois além de sua ação no sistema cardiovascular também participa do sistema imune (em macrófagos, leucócitos e neutrófilos atuando na defesa contra vírus, bactérias e protozoários), do sistema nervoso central e periférico como neurotransmissor de fibras NANC (não adrenérgicas não colinérgicas). No sistema nervoso, o óxido

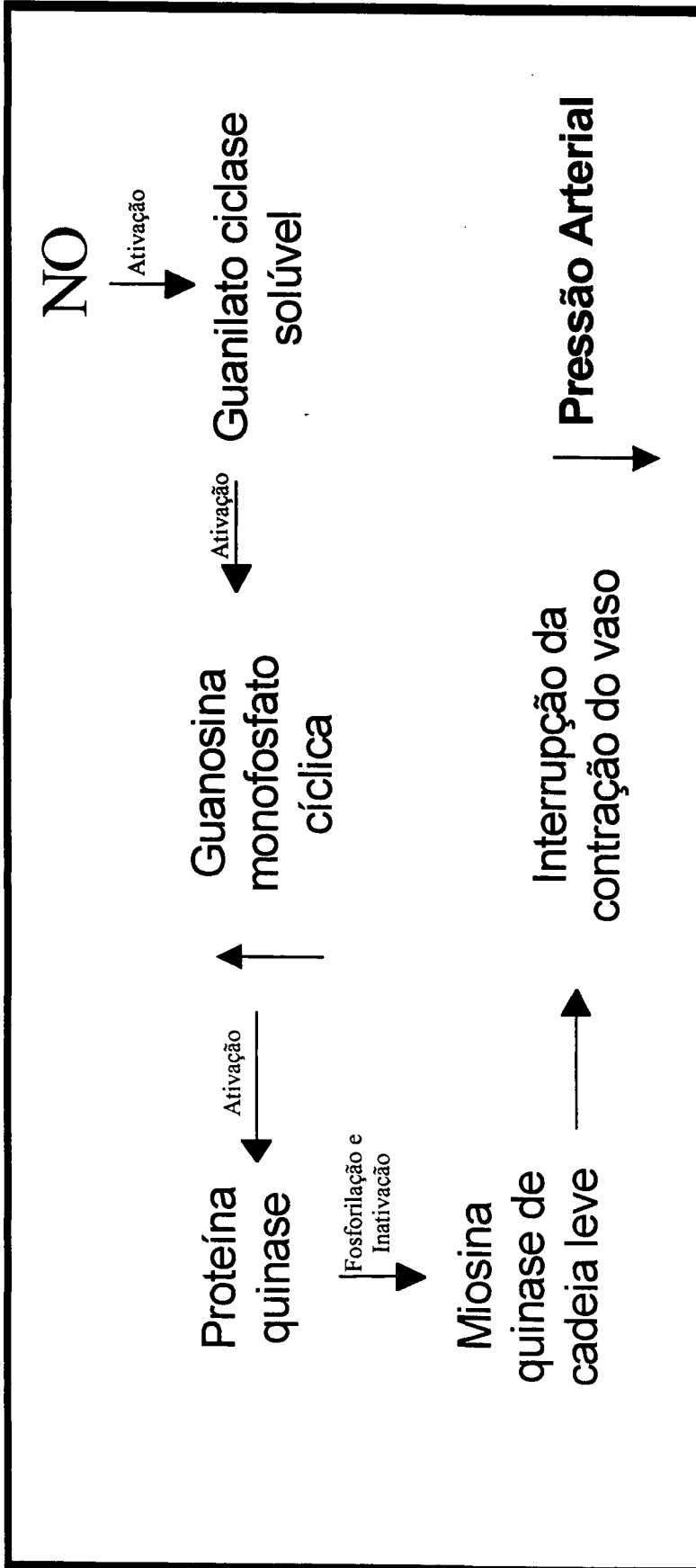


FIGURA 1. Representação esquemática do mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) na hipotensão.

nítrico atua na neurotransmissão, na potenciação de longo prazo, plasticidade, memória, controle do apetite e nocicepção (RANG *et al.*, 2004).

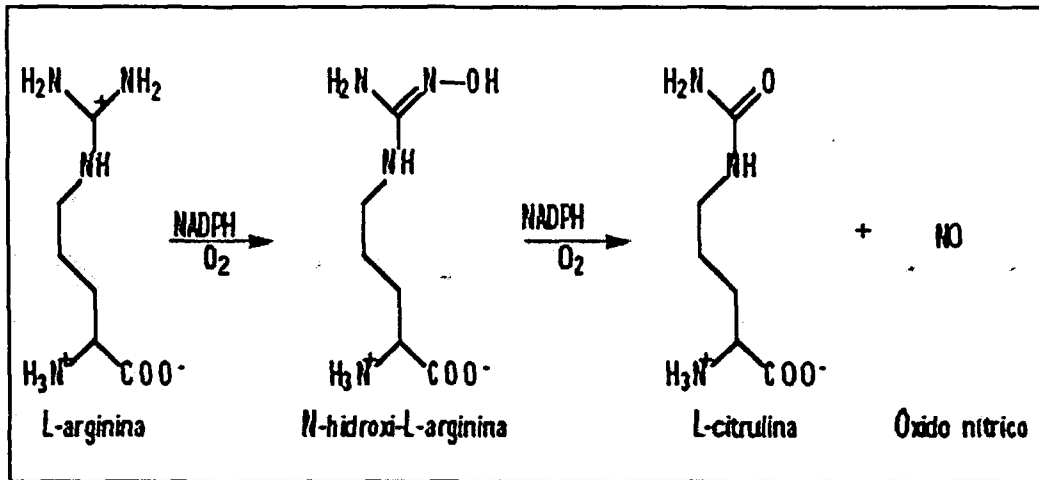


FIGURA 2. Síntese enzimática do óxido nítrico a partir da L-arginina pela ação da NOS (TEIXEIRA, 2001).

Outro aspecto importante relacionado às serino proteases é a atuação da trombina como uma potente molécula sinalizadora que regula respostas fisiológicas e patológicas em várias populações celulares e tecidos (TURGEON & HOUENOU, 1997). Através da clivagem limitada de receptores PAR (receptores protease ativados) ela controla o crescimento e funções de vários tipos celulares incluindo neurônios, astrócitos e microglia (macrófagos cerebrais). Vários estudos indicam que a trombina induz a liberação de citocinas e quimiocinas de células da microglia sugerindo uma importante participação no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SUO *et al.*, 2004).

Os receptores PARs pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Estudos de clonagem identificaram quatro membros deste grupo: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Eles estão distribuídos em diferentes tecidos

(KAWABATA & KURODA, 2000) e atuam na ativação de plaquetas, na regulação do tônus vascular, etc. (TABELA 2).

Nem todas as suas características foram totalmente esclarecidas: sabe-se que pelo menos três deles são ativados pela trombina (PAR-1, PAR-3 e PAR-4) e o PAR-2 é ativado pela tripsina. Alguns autores não descartam a hipótese de que outras serino proteases possam ativar um ou mais desses receptores (COUGHLIN, 1999).

Neste sentido, como uma primeira abordagem de uma possível ação da gioxina nos receptores PAR, é interessante verificar se esta tem como tecido alvo locais onde estes receptores estão presentes. Para tanto, será realizado um ensaio de biodistribuição abordando aspectos da DME (biodistribuição, metabolismo e excreção) tendo como radiotraçador a gioxina radioiodada.

As toxinas animais podem ser marcadas para o estudo de sua biodistribuição direta ou indiretamente através da incorporação de um radionuclídeo em sua estrutura:

- Diretamente quando se introduz o radiotraçador na molécula protéica, em seus cofatores, coenzimas ou metal, quando um desses constituintes estiver presente;
- Indiretamente através da acoplagem da toxina em uma molécula já marcada. O radiotraçador incorporado sinalizará o caminho da toxina durante todo o tempo em que estiver no organismo.

A DME de um composto estranho em um dado organismo depende de uma série de fatores físicos, químicos e fisiológicos (processos farmacocinéticos). Estes fatores removem e diluem o composto a partir do ponto de entrada no sistema biológico, o carregam para os diferentes tecidos, permitem sua difusão ou

TABELA 2. Possíveis atividades e localização dos receptores PAR (proteinase activated receptors).

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Distribuição tecidual (análise em Northern blot)	Cérebro, pulmão, coração, estômago, cólon, rim e testículos	Próstata, intestino médio, cólon, fígado, rim, pâncreas e traquéia	Coração, rim, pâncreas, timo, intestino grosso, estômago, linfonodos e traquéia	Pulmão, pâncreas, tireóide, testículos, intestino grosso, placenta, músculo esquelético, glândula adrenal, próstata, útero, cólon, plaquetas e megacariócitos
Expressão celular	Plaquetas, endotélio, músculo liso, leucócitos, trato gastrointestinal, epitélio, fibroblastos, neurônios e mastócitos	Endotélio, queratinócitos, pulmão, músculo liso, leucócitos, trato gastrointestinal, epitélio, fibroblastos, neurônios, mastócitos e células renais	Plaquetas e músculo liso	
Atividade fisiológica conhecida	Ativação de plaquetas			Ativação de plaquetas
Possível Atividade fisiológica	Regulação do tônus vascular, modulação da nocicepção, pro-inflamatória e desenvolvimento embrionário	Regulação do tônus vascular, modulação da nocicepção, pro-inflamatória	Cofator para PAR-4	Ativação de plaquetas

o transportam ativamente através das membranas e, finalmente, determinam sua acumulação, disposição e excreção (COLOMBETTI, 1982).

A taxa de distribuição nos tecidos de cada órgão é determinada pelo fluxo sanguíneo de perfusão e pela facilidade com a qual as moléculas da substância atravessam a parede capilar e penetram nas células do tecido (GIBALDI, 1991).

Dentre os vários fatores fisiológicos que facilitam a entrada ou aderência de algumas moléculas à membrana citoplasmática estão as vias de comunicação celular como os receptores de membrana. Dentre os receptores de membrana os protease-ativados (PARs) podem ser uma das vias de contato da gioxina para determinação de sua atividade no organismo.

2. OBJETIVOS

Considerando este contexto, o desenvolvimento deste trabalho visa contribuir para o conhecimento dos mecanismos de ação da gioxina. Para tanto as seguintes etapas serão desenvolvidas:

- a. obter e caracterizar a gioxina pura do veneno de *Crotalus durissus terrificus*;
- b. testar a atividade na pressão arterial;
- c. avaliar a participação do óxido nítrico em seu mecanismo de ação;
- d. estudar os aspectos da biodistribuição utilizando [¹²⁵I]gioxina como traçador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- ✓ Os reagentes utilizados foram todos de grau p.a., marca Merck.
- ✓ O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, na forma liofilizada, foi cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP (UNESP, Botucatu).
- ✓ Os animais utilizados foram obtidos do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN - onde foram mantidos em salas com controle de temperatura, com água e comida *ad libitum*, em ciclo de luz natural. Todas as manipulações seguiram os procedimentos ditados pelo COBEA.

3.1. Obtenção da giroxina

A giroxina foi obtida pelo fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se coluna de afinidade e gel filtração.

As eluições foram acompanhadas pela densidade óptica das frações, determinadas em 280 nm, 1 cm, em espectrofotômetro Pharmacia, Ultrospec III.

3.1.1. Cromatografia em coluna de afinidade

Para a coluna de afinidade, ativou-se a resina Benzamidina Sepharose 6B (Pharmacia) com lavagens alternadas de tampão Tris HCl 100mM pH 9,0 contendo NaCl 50mM e tampão acetato de amônio 50mM pH 4,5.

Aproximadamente 300 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus* foram dissolvidos em 4mL de solução tampão Tris HCl 100mM pH 9,0, posteriormente

centrifugados a 10.000g durante 1 minuto e o sobrenadante aplicado na coluna de afinidade em um sistema de cromatografia rápida (FPLC) em um fluxo de 0,5mL/min a baixa temperatura. Foram coletadas frações de 1,25mL. A eluição foi feita com tampão acetato de amônio 50mM pH 5,0. Em seguida as frações com atividade esterásica foram reunidas, analisadas em SDS-PAGE e liofilizadas.

3.1.2. Cromatografia em gel filtração

Nesta etapa foi utilizada a coluna Superdex 75 (XK 1,6 x 70) equilibrada em tampão formiato de amônio 0,1M pH 3,0.

Para a calibração da coluna foram utilizados dois padrões de massa molecular (PM) que permitiram determinar o volume de exclusão (V_0) e o volume total (V_t) e uma amostra do veneno total (30mg/mL) para determinar o volume de eluição (V_e) das principais proteínas deste veneno, facilitando a identificação nas outras preparações. Para o V_0 foi usado o Azul de dextrana (> 2.000.000) e para V_t o TAME (378,9 Daltons).

Para a purificação em gel filtração, o liofilizado foi dissolvido em 1mL de tampão formiato de amônio 0,1M pH 3,0 e centrifugado a 10.000g durante 1 minuto. O sobrenadante foi aplicado na coluna Superdex 75. Foram coletadas frações de 1,0 mL, em fluxo constante de 0,5 mL/min.

3.1.3. Concentração protéica

A concentração protéica das amostras foi determinada com o método de BRADFORD (1976). Este baseia-se na capacidade das proteínas de interferir com

a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional da cor, detectável em 595nm.

Para a curva padrão fez-se uma diluição seriada da albumina bovina sérica (SAB) 1mg/mL em solução salina: 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL; 0,0625mg/mL (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16). Em seguida, 100µL de cada amostra de albumina foram diluídas em 3,0mL do reagente, em duplicatas.

As amostras eluídas das cromatografias foram analisadas nas mesmas condições.

A densidade óptica foi determinada em 595 nm, em espectrofotômetro Pharmacia, Ultrospec III.

Os dados da curva padrão foram ajustados com o programa GRAPH PAD PRISM, pela regressão linear com a equação $Y = aX + b$ para calcular a concentração protéica das amostras, sendo (Y) a densidade óptica, (X) a concentração protéica, (a) o coeficiente angular da reta e (b) o intercepto da reta.

3.2. Ensaios de caracterização

Estes métodos foram inicialmente utilizados para acompanhar a purificação da giroxina e posteriormente verificar a atividade, integridade e determinar a massa molecular.

3.2.1. Atividade Esterásica

Neste ensaio foi utilizado o método descrito por NOLAN *et al.* (1976). Para determinação da atividade esterásica, as frações geradas nas duas etapas

cromatográficas, foram dissolvidas em tampão Tris HCl 0,08M pH 8,1 contendo CaCl_2 0,02M. Como padrão, foi utilizado a tripsina (1mg/mL) em solução de ácido clorídrico 0,001M.

Na reação foram incubados 1mL do substrato TAME 2,5mM com 50 μ L da amostra e medida a densidade óptica em 247 nm, a cada 30 segundos, durante 5 minutos.

3.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise em eletroforese seguiu o método descrito por LAEMMLI (1970) em um sistema desnaturante não reduzido. Objetivou observar a composição protéica dos principais picos dos fracionamentos e estimar a massa molecular da giroxina isolada.

As concentrações dos géis foram para resolução 15% e para empilhamento 6%.

As amostras (40 μ g) e padrões de massa molecular foram desnaturadas em tampão Tris HCl 0,08M pH 6,8 SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1% e aquecidas à 85°C por 5 minutos. O azul de bromofenol foi utilizado como traçador e permitiu acompanhar a evolução da eletroforese.

Para a corrida foi utilizado tampão Tris 0,025M glicina 0,20M, pH 8,3 e SDS 1%; uma corrente fixa de 30mA e voltagem máxima de 100V à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi corado em uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 0,4% em metanol 50% e ácido acético 7%, por 1 hora e, em seguida, descorado em uma solução de ácido acético e etanol (1:3) à temperatura ambiente.

A migração de cada banda foi medida e relacionada com a do traçador, calculando-se a migração relativa (R_m)

$$R_m = \frac{\text{Migração de cada banda protéica (em cm)}}{\text{Migração do traçador (em cm)}}$$

A massa molecular foi estimada pela relação inversamente proporcional das massas moleculares (em log) e da migração relativa (R_m) de cada proteína.

$$\text{Log}_{10} \text{MM} = A + B.R_m, \text{ onde}$$

- B representa a inclinação da reta e é diretamente proporcional ao tamanho da proteína (ou massa molecular).

3.2.3. Análise em espectrometria de massa

O outro método utilizado para determinar a massa molar da gioxina, foi a análise em espectrômetro ETTAN – MALDITOF (Amersham Bioscience) do CAT (Centro de Toxinologia Aplicada) no Instituto Butantan.

A amostra (1 µL de gioxina a 5 mg/mL em água destilada) foi diluída em 1 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) e a seguir, analisada.

As condições foram: voltagem de aceleração 20000 V, modo linear positivo, pulso do laser: 3 ns, com 20 pulsos por segundo. Os espectros foram processados com o programa ETTANS LWS.

3.2.4. Atividade coagulante

Efeito na coagulação do sangue em teste *in vitro*: Foram coletados aproximadamente 350 μL de sangue de camundongos Swiss, com pipeta Pasteur heparinizada, pela veia do plexo orbital, após anestesia dos animais. O sangue foi acondicionado em tubos heparinizados e mantido a 37°C em banho maria. Após homogeneização, foram separadas 4 alíquotas de 50 μL de sangue nas quais foram adicionadas mais 50 μL de heparina 250 U.I. e em seguida, giroxina (1 mg/mL em salina) nas doses 50 Colocar quanto de giroxina por μL , 25 μL , 12,5 μL e 6 μL . As amostras foram mantidas a 37°C e a cada 60 segundos observou-se se ocorreu a coagulação. O período máximo de observação foi de 120 minutos.

3.2.5. Neurotoxicidade

O comportamento característico causado pela giroxina é o rolamento em barril. Para observação deste efeito neurotóxico foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos, pesando entre 25 e 30 gramas. A toxina foi dissolvida em salina na concentração de 2 mg/mL e foram administrados de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo, via endovenosa (veia caudal).

Os animais ficaram sob observação e filmagem por aproximadamente 60 minutos para registro do efeito.

3.2.6. Efeito na pressão arterial de ratos anestesiados

Ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 350 g, foram anestesiados com pentobarbital sódico (Nembutal[®], 60 mg/kg, *i.p.*). Após traqueostomia e administração de heparina (200 a 300 U *i.v.*), a veia jugular direita foi canulada para administração de drogas. A pressão arterial carotidiana média foi avaliada continuamente com um transdutor fisiológico de pressão acoplado a um polígrafo Statham Gould (com escala de calibração de 0-200 mmHg). Após estabilização da pressão arterial, a viabilidade da preparação foi avaliada com a administração de drogas-controle: [A] hipertensora (Angiotensina I - 100 ng) e [B] hipotensora (Bradicinina sintética – 500 ng).

Todas as drogas foram diluídas em solução fisiológica e injetadas em um volume final de 300 μ L. A possível hipotensão causada pela gioxina foi avaliada através da medição do efeito hipotensor em relação à linha de base do traçado.

3.2.7. Efeito em células endoteliais em cultura

Para o ensaio da atividade da gioxina em células endoteliais em cultivo foram utilizadas as células ECV304, gentilmente cedidas pela Dra. Helena Nader do Departamento de Bioquímica da UNIFESP. Estas células são espontaneamente transformadas e originadas de veia umbilical humana.

Neste ensaio foi medida a atividade das enzimas NOS constitutiva e induzida na presença e ausência da gioxina.

As células ECV304 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina 4mM na presença de penicilina

100U, estreptomicina 10 μ g/ mL e anfotericida B 0,25 μ g/ mL. Foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂.

Para o ensaio foi escolhido trabalhar com as células em semi-confluência. Para tanto foram distribuídas 90.000 células/3mL de meio por placa com 50 mm de diâmetro. Após aproximadamente 72 horas, as células estavam semi-confluentes, em condições ideais para o teste (em torno de 300.000 células/placa).

A giroxina foi diluída no meio de cultura sem soro para obter as concentrações desejadas.

As células foram expostas a giroxina 0,15 μ M por 15, 55, 95 e 135 minutos para a determinação da NOS total. Para i-NOS foi utilizado giroxina 0,03 μ M e 95 minutos de exposição.

Ao término de cada tempo de incubação o meio de cultura foi aspirado e imediatamente adicionados 2 mL de PBS e as células foram descoladas do fundo da placa com auxílio de um raspador. Em seguida a suspensão celular foi transferida para um tubo de plástico de fundo cônico (15 mL) e procedeu-se uma lavagem da placa com mais 1 mL de PBS. Os conteúdos de três placas foram reunidos em 1 tubo que foi centrifugado em seguida a 2000g, por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado a - 80°C até o ensaio de atividade da NOS.

No ensaio da NOS cada ponto (concentração x tempo) foi ensaiado no mínimo em duplicata de tubo.

Nas placas controles adicionou-se o meio de cultura sem giroxina e todas as demais etapas do processo foram iguais.

Três placas de cada grupo foram fixadas com ácido acético – metanol (1:3) durante 20 minutos e corados com Giemsa 10% (diluído em tampão Sorensen pH 6,8) também por 20 minutos, enxaguadas duas vezes em água destilada e secas à temperatura ambiente por uma noite. Foram fotografadas em microscópio Nikon – TMS utilizando filme Fuji – Superior, asa 100 em um aumento de 100 e 200 vezes.

3.2.7.a. Determinação da atividade da Óxido Nítrico Sintase

O método utilizado baseia-se na estimativa da atividade da NOS pela conversão de L-Arginina para L-Citrulina usando ³H-Arginina como referencial da conversão (FERREIRO *et al.*, 2004).

Inicialmente as células ECV-304 foram ressuspendidas em tampão de homogeneização, pH 7,4 (HEPES 0,02M; sacarose 0,32M; DTT 0,001M; EDTA 0,0001 M; PMSF 0,001M) e sonicadas para ruptura. Em seguida, foi medido o conteúdo total de proteínas celulares com o método micro-Bradford (kit marca Bio Rad[®]).

A curva padrão foi feita com soro albumina bovina diluída no intervalo de 0,5 a 8 µg/µL. Os procedimentos deste ensaio são similares ao descrito no item 3.1.3.

Após a medida de cada amostra as concentrações foram ajustadas para 50µg/100µl com tampão.

Para o ensaio, todas as amostras foram pré-tratadas em colunas de troca iônica (DOWEX 50 WX 8 200 – 400, marca Sigma) para retirada da arginina endógena presente na suspensão celular (a arginina ficou retida na coluna). As

condições escolhidas para o ensaio foram arginina 1 μ M (fria e marcada) e 15 minutos de incubação.

O ensaio da NOS foi então realizado incubando-se 50 μ g de proteína total com HEPES 0,03M; EDTA 0,001M; CaCl₂ 0,00125M; NADPH 0,001M; calmodulina 10 μ g/mL; FAD 0,004M; BH₄ 0,025M; arginina 1,2x10⁻⁹M; ³H-arginina (0,5 μ Ci) em um volume final de 200 μ L, à 37°C com agitação. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de HEPES 0,02M e os tubos colocados no gelo.

A ³H-citrulina foi separada da ³H-arginina por cromatografia de troca iônica nas mesmas condições usadas para a suspensão celular. Dessa forma, toda radiação presente em cada amostra será reflexo da concentração do produto da enzima, indicando assim, a atividade da NOS presente.

Para determinar a atividade da i-NOS foram adicionados ao tampão de homogeneização das células, EDTA/EGTA. Não foram adicionados CaCl₂ e calmodulina ao meio de reação. As demais etapas do ensaio seguiram igual as da NOS constitutiva.

Os eluatos foram transferidos para frascos de cintilação e após adição de 10 mL de líquido de cintilação em cada frasco, a radioatividade foi quantificada com a utilização de um contador beta.

As contagens em c.p.m. (contagem por minuto) foram convertidas para d.p.m. (decaimento por minuto) e calculada a atividade específica pela fórmula:

$$\text{Atividade NOS (pmol/mg.min)} = \frac{[\text{arginina}] - {}^3\text{H-citrulina} - \text{branco}}{(\text{Total} - \text{branco}) \times \text{tempo (min)} \times \text{proteína (mg)}}$$

O controle negativo usado como branco da reação, foi obtido usando o mesmo procedimento de uma amostra, omitindo-se a enzima.

Para verificar a significância das diferenças entre as atividades da NOS nos grupos (controle e tratados com a gioxina) foi utilizada a análise de variância monocaudal, com o Pós-teste *Dunnet* ou *Newnan-Keuls*; com auxílio do programa GRAPH PAD PRISM.

3.2.8. Ensaio *in vivo* com inibidores da NOS

Para o teste com os inibidores foram utilizados camundongos Balb C divididos em 2 grupos de 5 animais, pesando entre 26 a 30 g.

O primeiro inibidor utilizado foi o 7-Nitroindazol (7-Ni) – Neste ensaio o grupo controle foi injetado, via intraperitoneal, com 0,1 mL de DMSO 30 minutos antes da toxina. No segundo grupo foi injetado, via intraperitoneal, em torno de 0,1 mL da solução de 7-Ni (25 mg/Kg) dissolvido em DMSO, no mesmo intervalo de tempo.

O esquema de administração foi baseado em ZAMUNER *et al.* (2001).

O segundo inibidor utilizado foi o L-NAME. Neste ensaio, no grupo controle foram injetados 0,2mL de salina em duas doses. A primeira, 24 horas e a segunda, 30 minutos, antes da toxina. No grupo experimental foram injetados 0,2mL da solução de L-NAME dissolvido em salina (50mg/Kg corpóreo) nos mesmos intervalos de tempo.

A dose de gioxina injetada em todos os grupos foi 0,25µg/g de peso corpóreo, via intravenosa (veia caudal).

Todos os animais (grupos controle e grupos tratados com os inibidores) foram mantidos sob observação visual durante 1 hora e anotados todos os

sintomas (rolamento em barril, frequência respiratória, agitação, comportamento exploratório, tônus muscular entre outros).

3.2.9. Estudo da biodistribuição

3.2.9.a. Radioiodação da giroxina

A giroxina foi radioiodada com Na^{125}I utilizando-se o método clássico da cloramina T (CAMILLO, *et al.*, 1997). A cloramina T é um agente oxidante, que em solução aquosa forma o ácido hipocloroso capaz de promover a oxidação do iodeto. O esquema da reação é mostrado na FIGURA 3 na qual estão indicados os reagentes e os tampões usados. Este procedimento foi realizado em pH alcalino e em capela química, devido à volatilidade do ^{125}I . Foram feitas agitações após a adição de cada reagente e aos 2,5 minutos após a adição da cloramina

Todas as soluções usadas foram preparadas imediatamente antes do uso. A mistura de reação foi fracionada em coluna Sephadex G. 100 (3x50 cm). A calibração da coluna foi com azul de dextrana para o V_0 ; ^{125}I para o V_t e giroxina fria para o V_e . A constante K_{av} (característica de cada soluto) foi calculada por:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

O tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 contendo SAB 0,1% foi utilizado como eluente, com fluxo de 12 mL/h e foram coletadas frações de 2 mL.

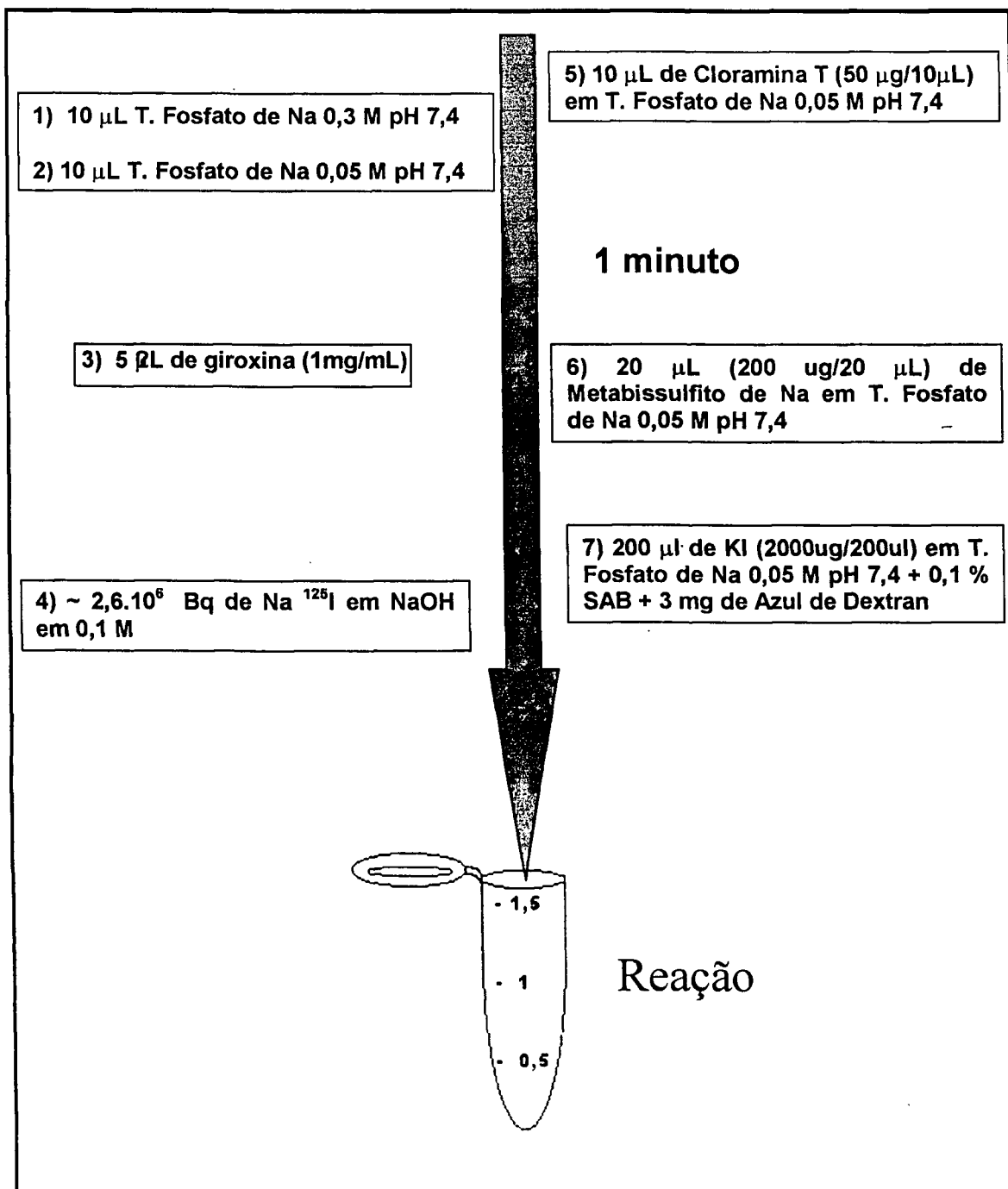


FIGURA 3. Esquema da radioiodação da gioxina com Na ^{125}I utilizando-se o método clássico da cloramina T modificado (CAMILLO et.al., 1997).

Amostras de 20 μL de cada tubo foram contadas em contador gama de poço (OAKFIELD Instruments, United Kingdom) para obtenção do perfil cromatográfico.

Os picos obtidos no fracionamento da mistura de marcação foram analisados em SDS-PAGE, método já descrito no item 3.2.2. Após o fim da corrida o gel foi cortado em tiras verticais correspondentes a cada amostra e, em seguida, em segmentos horizontais de 5 mm.

A migração relativa (R_m) foi calculada da mesma forma descrita anteriormente (item 3.2.2.).

3.2.9.b. Biodistribuição

No ensaio com a [125 I]giroxina foram utilizados 30 camundongos machos isogênicos B10.PL, pesando 20 ± 3 g, divididos em 10 grupos de 3 animais cada. Os animais foram inoculados via endovenosa na veia da cauda, com 0,1 mL da [125 I]giroxina com atividade 18,5 MBq. Durante os experimentos, os animais ficaram em sala com temperatura ambiente, luz natural e receberam água *ad libitum* e comida. Após intervalos de 3, 5, 15, 30, 60, 180, 360, 600, 1500 e 2880 minutos, os animais foram anestesiados com éter para a retirada de sangue do plexo orbital com pipeta Pasteur heparinizada. Em seguida, foram retirados o cérebro, coração, pulmões, fígado, baço, rins, estômago, tireóide, intestino, estômago, músculo esquelético (fragmentos) e cauda. Os órgãos foram pesados e, em seguida, acondicionados em tubos de polipropileno. Das amostras de sangue foram contados 50 μ L de sangue total e 50 μ L de plasma. A radioatividade presente em cada amostra foi medida em contador gama poço (OAKFIELD Instruments, United Kingdom).

O primeiro passo para os cálculos foi a subtração da quantidade que permanece na cauda, do total da dose injetada. Em seguida foi feito o cálculo da dose presente em cada órgão.

Os resultados foram expressos como porcentagem da dose do radiotraçador incorporada por peso do órgão (%D/g). Esses cálculos foram feitos com o auxílio do programa EXCELL.

Para análise dos resultados utilizou-se duas representações gráficas. A primeira compara as médias (com os respectivos desvio padrão e erro padrão) das porcentagens da dose total incorporada por peso do órgão (%D/g) em dado tempo de amostragem. Nesta análise utilizou-se o programa STATISTICA.

A segunda representação dos dados, facilita visualizar a cinética. Neste caso, a porcentagem da dose incorporada por cada órgão (%D/g) é expressa em função do tempo, em um gráfico tipo XY. Para esta segunda análise foi utilizado o programa GRAPH PAD PRISMA.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção da giroxina

Os cromatogramas obtidos nas duas etapas necessárias para o isolamento da giroxina estão nas FIGURAS 4 e 5.

4.1.1. Cromatografia em coluna de afinidade

A coluna de afinidade Benzamidina Sepharose 6B (FIGURA 4) separou dois picos distintos. O primeiro que não interagiu com a coluna (Pico AP1) e o segundo, o pico de interesse (Pico AP2), que eluiu com a mudança de pH (de 9,0 para 4,5).

4.1.2. Cromatografia em gel filtração

O pico AP2 obtido na coluna de afinidade foi repurificado na cromatografia em gel filtração. Estas frações eluíram como um pico majoritário com V_e compatível com a giroxina (SA); identificado na comparação com o perfil cromatográfico do veneno total.

Ensaio enzimáticos específicos caracterizam o pico SA como sendo o referente a giroxina (FIGURA 5). Os picos SB e SC são contaminantes.

4.1.3. Concentração protéica

No ensaio de medida do conteúdo protéico das amostras eluídas nas cromatografias, a curva padrão de SAB foi ajustada pela equação $y = 0,77195x + 0,01911$ com $r^2 = 0,9986$. O rendimento final da purificação da giroxina foi 2,0%.

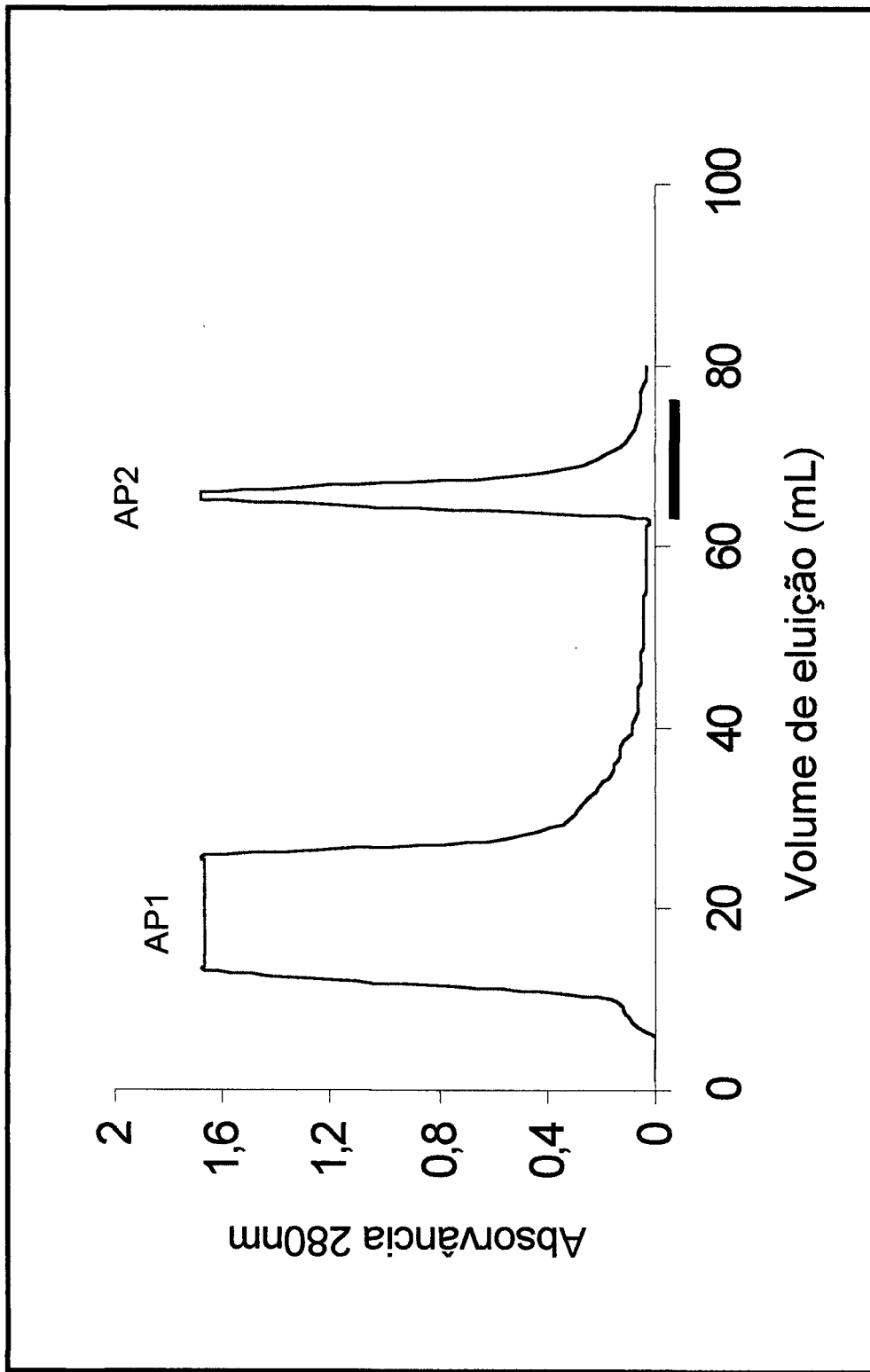


FIGURA 4. Perfil cromatográfico da coluna de afinidade Benzamida Sepharose 6B. Para o veneno de *Crotalus durissus terrificus* aplicação foi em tampão Tris HCl 100mM pH 9,0 a eluição em acetato de amônio 50mM pH 4,5. A detecção foi feita em 280 nm, Fluxo 0,5 mL/min. Volume fração 1,25 mL. (—) frações positivas para atividade enzimática.

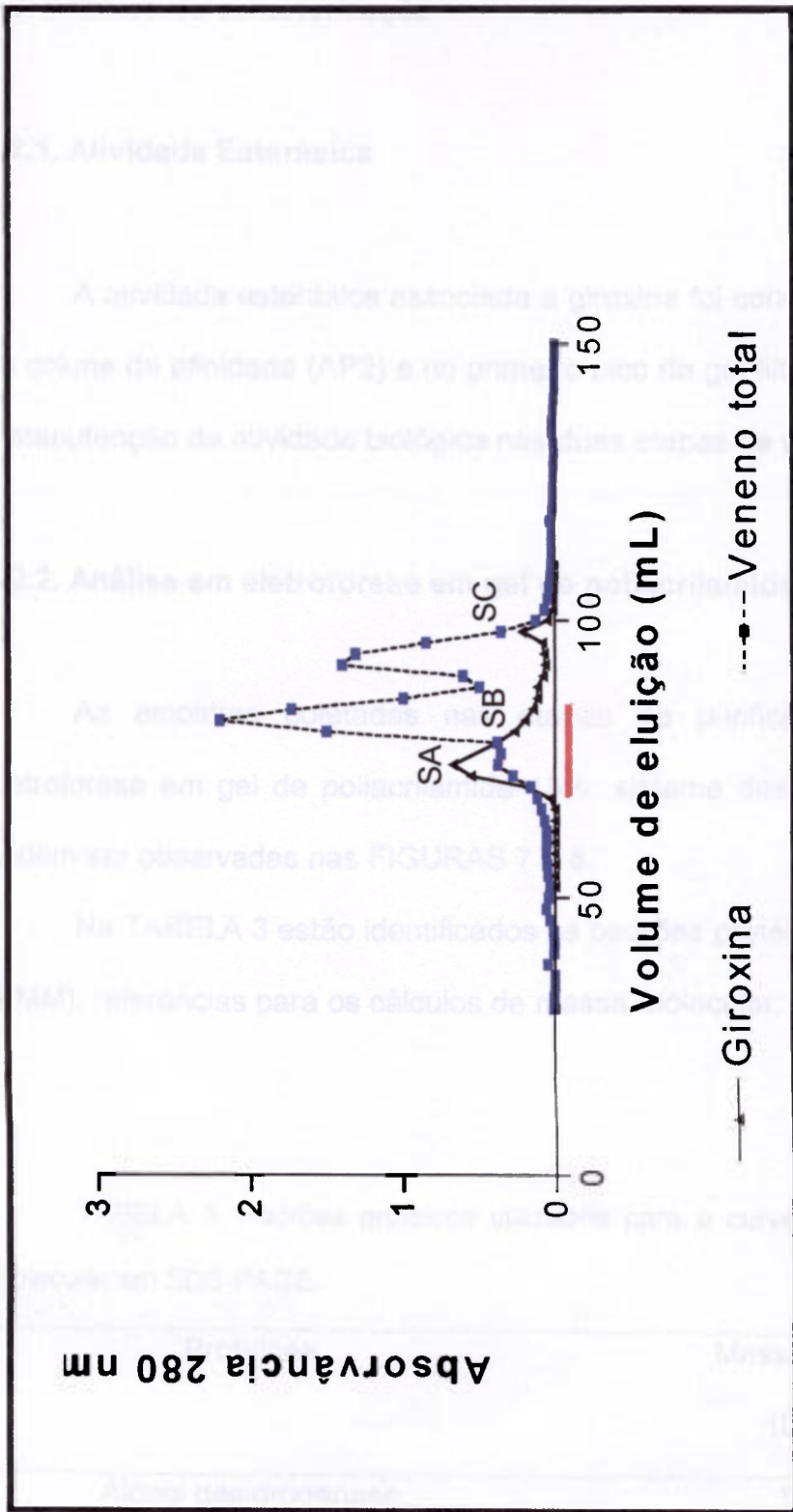


FIGURA 5. Perfil cromatográfico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (pico AP2 pré-fractionado em coluna de afinidade) em Superdex 75 (1,6x70). (---) Perfil referente ao veneno total. O tampão eluente foi formiato de amônio 100 mM pH 3,0; fluxo 0,5 mL/min; frações de 1 mL. A detecção foi feita em 280 nm. (—) Frações positivas para atividade enzimática.

4.2. Ensaio de caracterização

4.2.1. Atividade Esterásica

A atividade esterásica associada a giroxina foi confirmada no segundo pico da coluna de afinidade (AP2) e no primeiro pico da gel filtração (SA), confirmando a manutenção da atividade biológica nas duas etapas de purificação (FIGURA 6).

4.2.2. Análise em eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras coletadas nas etapas de purificação e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sistema desnaturante não reduzido, podem ser observadas nas FIGURAS 7 e 8.

Na TABELA 3 estão identificados os padrões protéicos de massa molecular (PMM), referências para os cálculos de massa molecular.

TABELA 3. Padrões protéicos utilizados para a curva de calibração de massa molecular em SDS-PAGE.

Proteínas	Massa Molecular (Daltons)
Álcool desidrogenase	150.000
Soro albumina bovina	66.000
Anidrase carbônica	29.000
Citocromo C	12.400

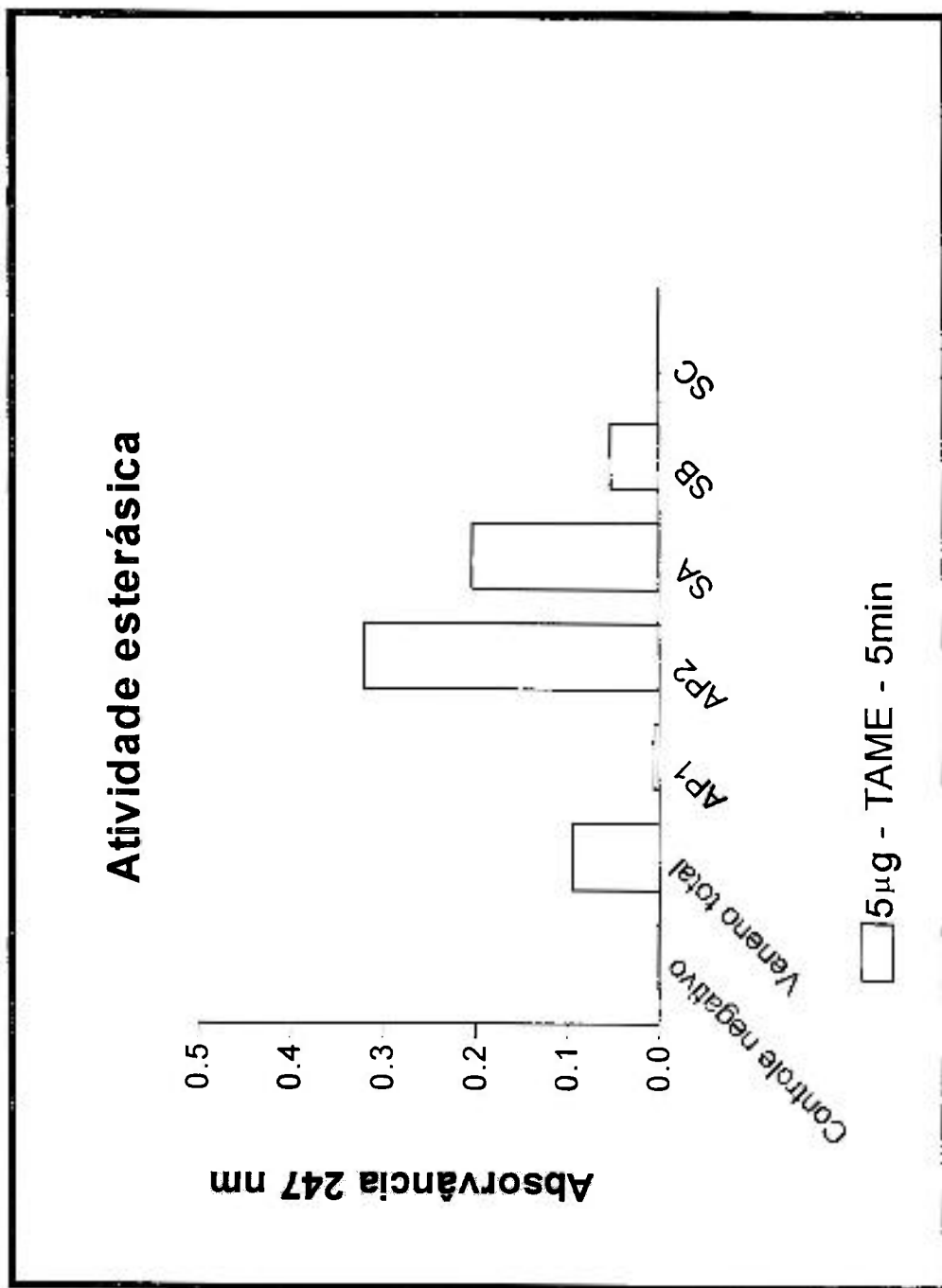


FIGURA 6. Gráfico da atividade esterásica em diferentes etapas da purificação da gioxina. Amostras 5µg; substrato TAME 2,5 mM; 5 minutos de reação; temperatura ambiente. Para o controle negativo foi utilizado a mistura de reação na ausência da gioxina.

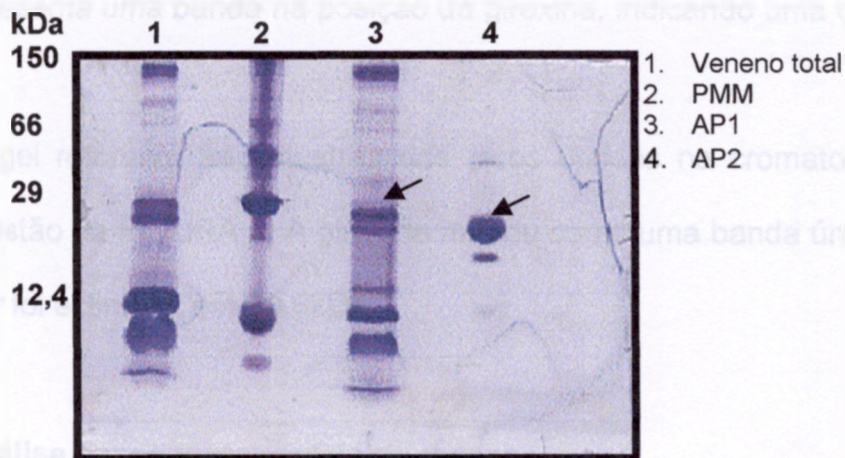


FIGURA 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sistema desnaturante não reduzido com SDS. As setas indicam as bandas referentes a gioxina. Análise dos picos separados na cromatografia por afinidade (AP1 e AP2).

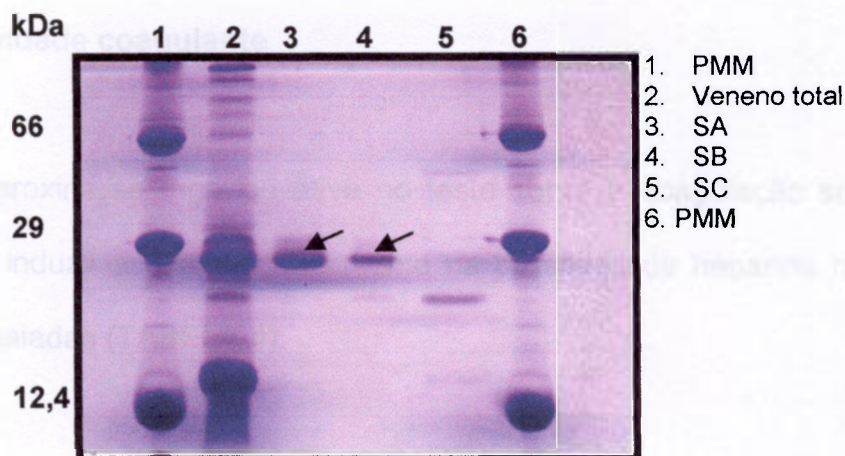


FIGURA 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sistema desnaturante não reduzido com SDS. As setas indicam as bandas referentes a gioxina. Análise dos picos separados na cromatografia em gel de filtração (SA, SB e SC).

Na FIGURA 7 pode-se observar as bandas referentes às amostras dos picos da coluna de afinidade. O pico referente às proteínas não retidas (AP1) ainda apresenta uma banda na posição da giroxina, indicando uma certa perda de material.

O gel referente às amostras dos picos obtidos na cromatografia em gel filtração estão na FIGURA 8. A giroxina migrou como uma banda única e a massa molecular foi estimada em 30,6kDa.

4.2.3. Análise em espectrometria de massa

Nas condições desse trabalho, a análise da giroxina por espectrometria de massa identificou um componente majoritário e algumas impurezas não quantificadas, porém em baixa concentração (FIGURA 9). O valor de massa molecular calculado foi 29506,63 Da, estando de acordo com o esperado.

4.2.4. Atividade coagulante

A giroxina se mostrou ativa no teste sobre a coagulação sanguínea. Foi capaz de induzir a coagulação mesmo na presença de heparina nas diferentes doses ensaiadas (TABELA 4).

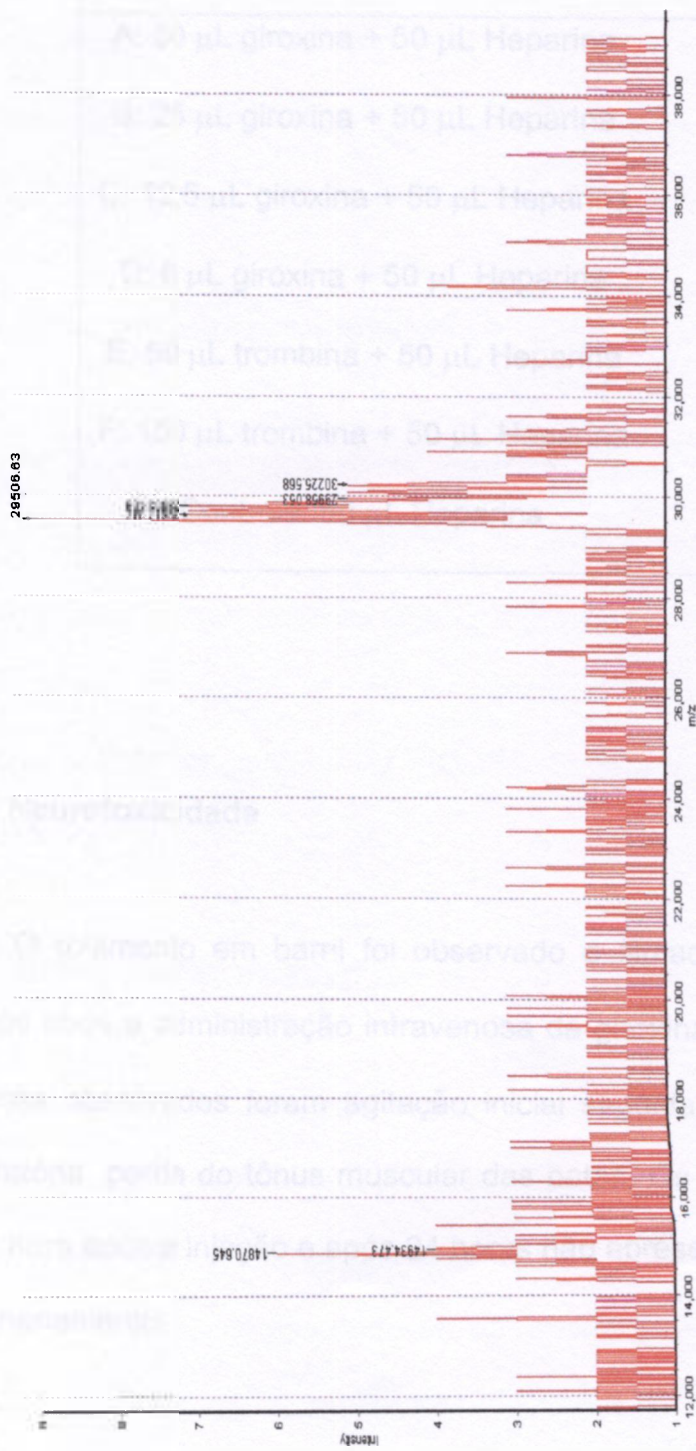


FIGURA 9. Espectro de massa da gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Espectrômetro ETTAN – MALDITOF pro (Amersham Biosciences).

TABELA 4. Resultado do teste da coagulação sanguínea ativada pela giroxina.

Incubação	Atividade coagulante
A: 50 μ L giroxina + 50 μ L Heparina	+
B: 25 μ L giroxina + 50 μ L Heparina	+
C: 12,5 μ L giroxina + 50 μ L Heparina	+
D: 6 μ L giroxina + 50 μ L Heparina	+
E: 50 μ L trombina + 50 μ L Heparina	-
F: 150 μ L trombina + 50 μ L Heparina	+
Controle: 50 μ L Heparina	-

4.2.5. Neurotoxicidade

O rolamento em barril foi observado e filmado, ocorrendo entre 5 e 15 minutos após a administração intravenosa da giroxina na dose 0,25 μ g/g. Outros sintomas observados foram agitação inicial seguida de aumento da frequência respiratória, perda do tônus muscular das patas. Os animais se recuperaram em até 1 hora após a injeção e após 24 horas não apresentavam qualquer sintoma de envenenamento.

4.2.6. Efeitos na pressão arterial de ratos anestesiados

Os animais que receberam doses menores que 500 μ g não apresentaram nenhum efeito sobre a pressão arterial.

Os ratos tratados com 500 μ g de gioxina apresentaram uma queda acentuada e prolongada na pressão arterial (FIGURA 10).

4.2.7. Efeito em células endoteliais em cultura

As condições inicialmente propostas para as células ECV304 foram adequadas para a cultura. A primeira curva de crescimento celular mostrou que em 24 horas o número total de células é praticamente o dobro do inicial. As fotos evidenciaram alterações pouco significativas induzidas nas células ECV304 expostas à ação da gioxina. Na FIGURA 11 está a foto do grupo controle e dos grupos tratados.

4.2.8. Determinação da atividade da Óxido Nítrico Sintase

No ensaio de atividade da NOS em células endoteliais ECV304 após tratamento com gioxina, observou-se aumento de atividade da NOS total no sistema (FIGURA 12). Este aumento foi significativo para todos os intervalos de tempo ensaiados, comparando-se ao controle. A FIGURA 13 apresenta os resultados para a i-NOS. Embora as atividades da NOS total e da i-NOS fossem significativamente diferentes do grupo controle; na comparação entre ambas não houve diferença.

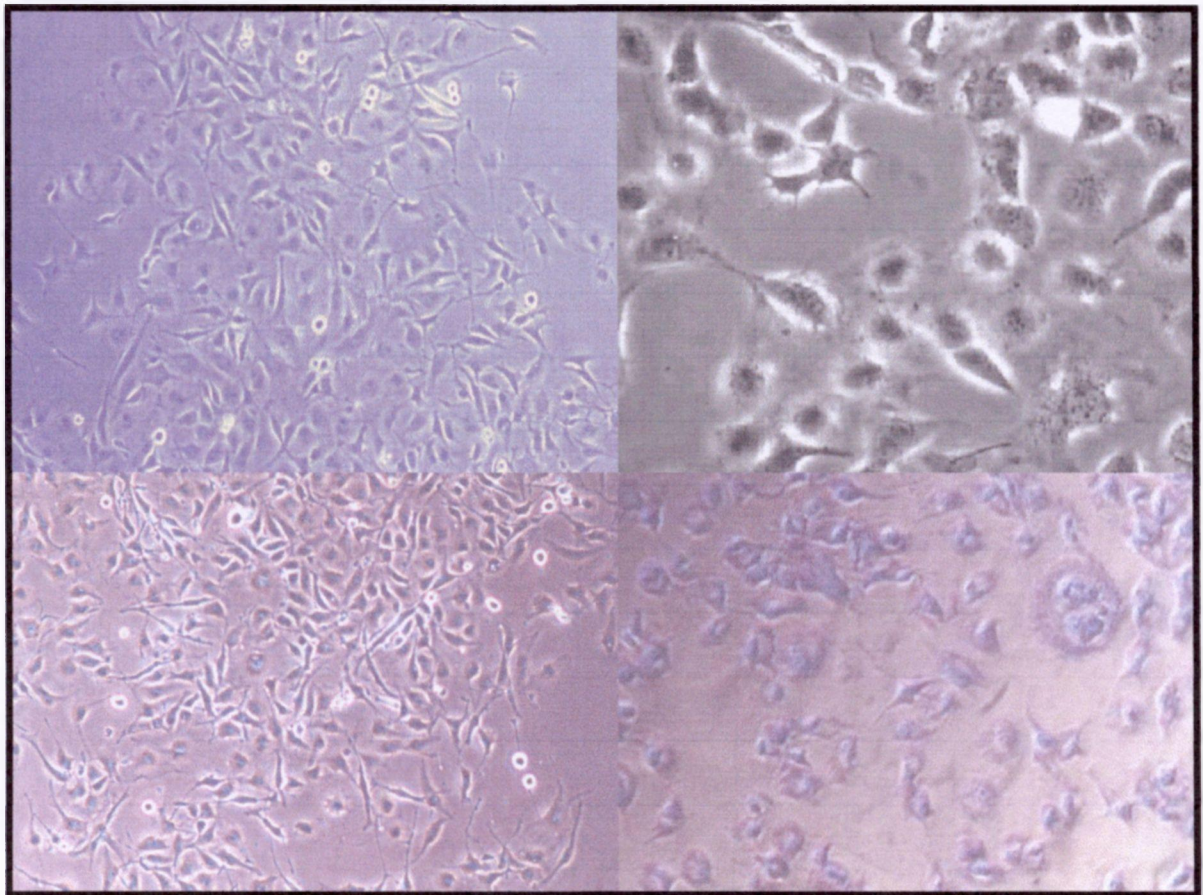


FIGURA 11. Fotos da cultura das células endoteliais ECV304. (A) Controle [100x]; (B) células ECV304 mantidas na Universidade de Barcelona <www.ub.es/biocel/wbc/recursos/coleccionphc.htm>; (C) células tratadas com gioxina 1 μg por 15 [100x] e (D) células tratadas com gioxina 1 μg por 135 minutos [200x].

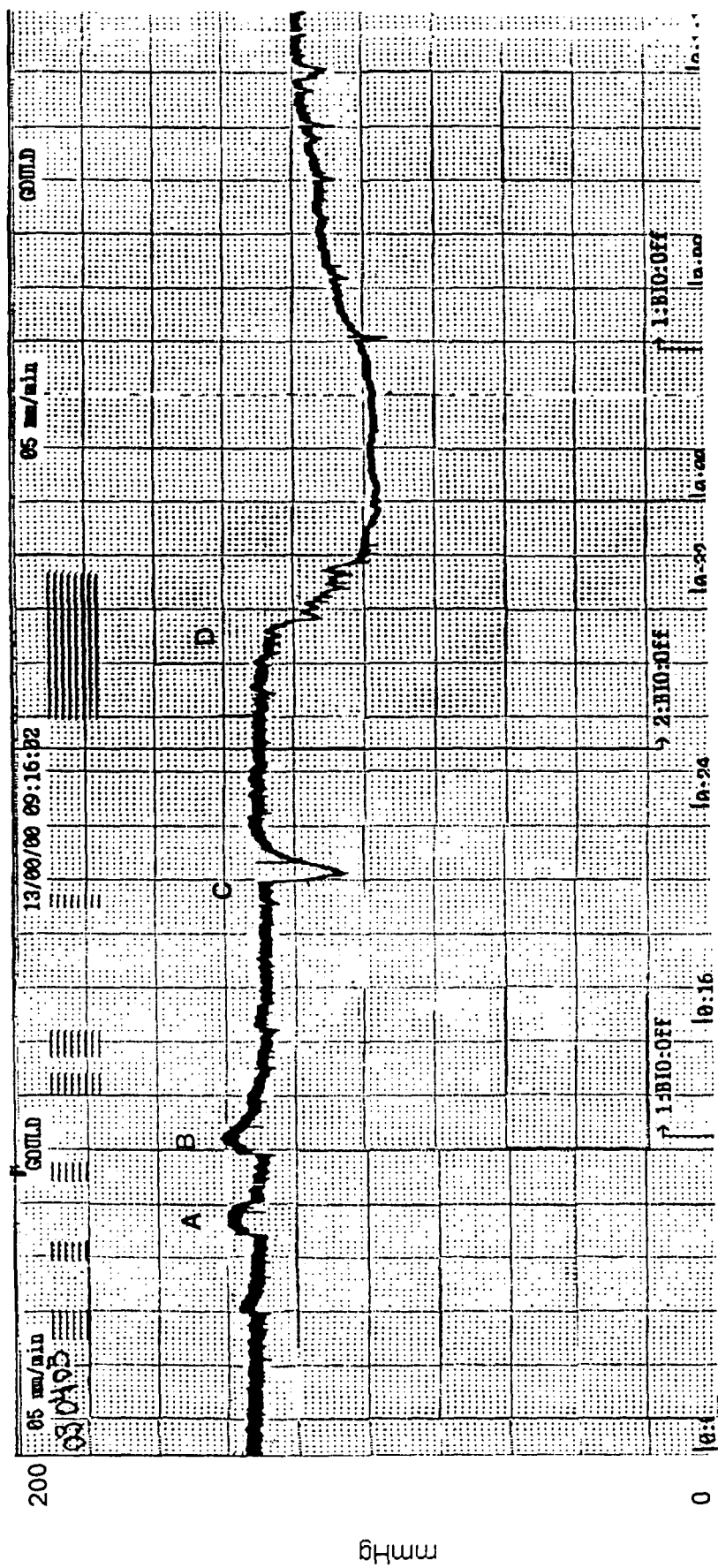


FIGURA 10. Efeito da enzima semelhante à trombina na pressão arterial de ratos anestesiados. A e B substância hipertensora (Angiotensina I); C substância hipotensora (Bradicina sintética) e D gioxina isolada do veneno crotálico.

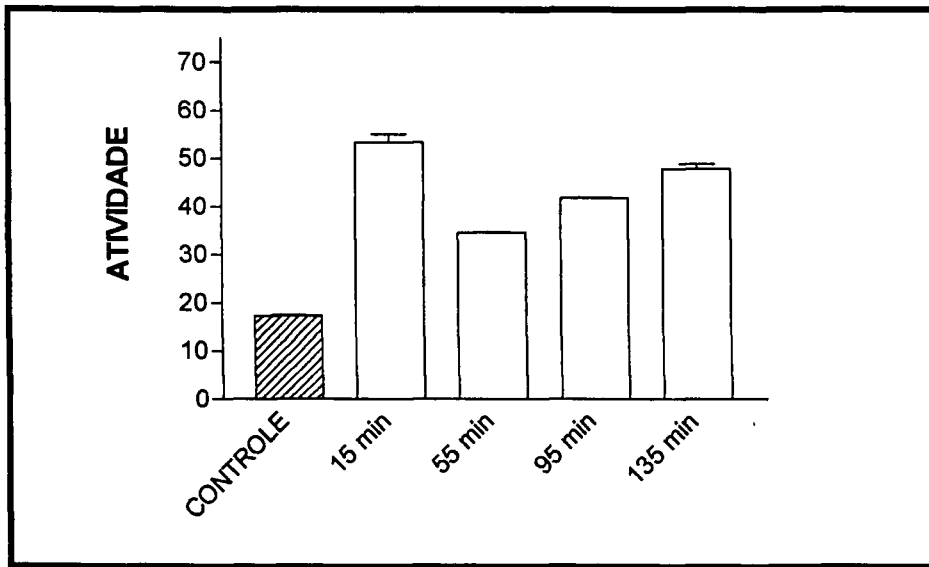


FIGURA 12. Atividade da NOS total (pmol/mg.min) determinada em células ECV304 expostas à gioxina 0,15 μ M durante diferentes intervalos de tempo. Os valores representam as médias \pm erro padrão. Pela análise de variância (F 243; r^2 0,9949) as médias são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e no teste de comparação múltiplas de Dunnet todas são diferentes do controle (p , 0,01).

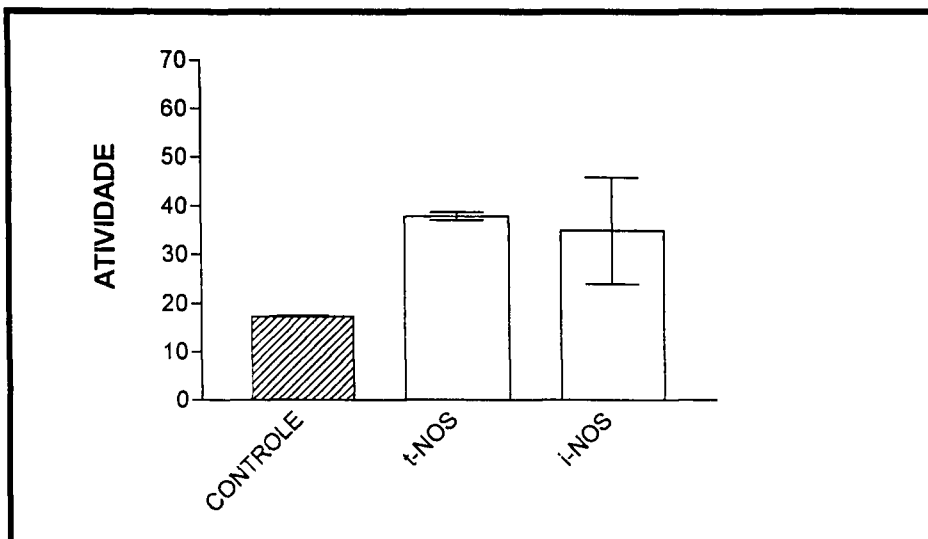


FIGURA 13. Comparação das atividades da NOS total e NOS induzida (pmol/mg.min) determinadas em células ECV304 expostas à gioxina 0,03 μ M durante 95 minutos. Os valores representam as médias \pm erro padrão. Pela análise de variância (F12,13; r^2 0,7294) as médias são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e no teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls os grupos tratados são diferentes do controle ($p < 0,01$) e não diferem entre si ($P < 0,05$).

4.2.9. Ensaio *in vivo* com inibidores da NOS

No ensaio com 7-Ni, os primeiros sintomas apareceram poucos minutos após a administração da gioxina. Não foram observadas diferenças entre os grupos controle e tratado com o inibidor. Em ambos os grupos os animais manifestaram os sintomas seqüenciais de agitação, aumento da frequência respiratória, ficaram parados, tiveram diminuição do tônus das patas e não apresentaram o rolamento em barril. Aproximadamente 1 hora após a injeção da toxina os animais se recuperaram e todos estavam completamente livres de qualquer sintoma após 48 horas. Não ocorreram mortes.

No ensaio com L-NAME, os animais tratados e os animais controle apresentaram todos os sintomas citados acima inclusive o rolamento em barril. Pôde-se observar uma diferença significativa na intensidade dos sintomas no grupo tratado com o inibidor. Neste grupo, os animais apresentaram o rolamento em barril e os demais sintomas por aproximadamente 60 minutos a mais que os do grupo controle, além de ocorrerem três mortes.

4.3. Estudo de biodistribuição

4.3.1. Radioiodação da gioxina

No perfil radiocromatográfico obtido em Sephadex G.100 referente ao fracionamento da mistura de marcação, pôde-se observar cinco picos distintos (FIGURA 14), sendo que dois deles foram relacionados à [¹²⁵I]gioxina por apresentarem Kav próximo ao da gioxina fria (C e D).

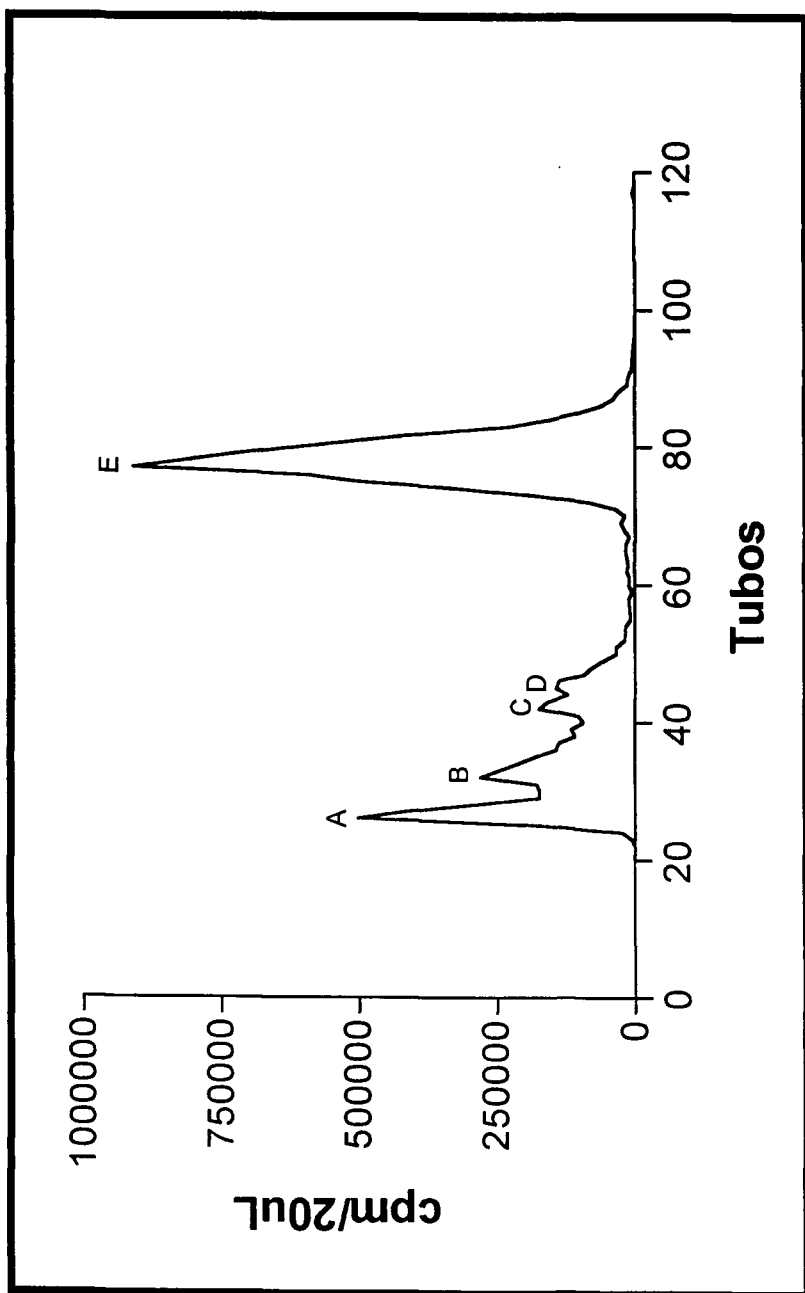


FIGURA 14. Cromatograma em gel Sephadex G. 100 (2,5 X 50) da mistura de marcação da gioxina com Na¹²⁵I. Eluição com tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,4 e SAB 0,1 %; volume de cada tubo 2,9 mL e fluxo 12 mL/h. Picos A e B, correspondem aos grupos de maior massa molecular (agregados e SAB); Picos C e D à gioxina marcada e o Pico E ao ¹²⁵I livre.

A análise em eletroforese destes picos permitiu comprovar a composição protéica de cada um (FIGURA 15). No pico A está a radioatividade aderida a albumina e agregados de maior massa molecular; no pico E está o ^{125}I livre e nos picos C e D, a giroxina. Por esta técnica a pureza da [^{125}I]giroxina isolada foi estimada em 85,4%. Apesar da semelhança dos dados eletroforéticos obtidos para as frações 42-43 e 45-46, optou-se por utilizar a de Kav mais próximo de 0,4, que é o Kav obtido no fracionamento da giroxina não marcada, nas mesmas condições cromatográficas.

4.3.2. Biodistribuição da [^{125}I]giroxina

O resultado deste ensaio foi analisado de duas formas. A primeira que compara a atividade total presente nos diferentes órgãos (FIGURAS 16 e 17) a cada intervalo de tempo. Esta representação facilita a observação do “caminho” feito pela [^{125}I]giroxina durante os processos de DME. A segunda forma de análise (FIGURA 18) apresenta o perfil cinético em cada órgão individualmente e permite a identificação dos órgãos em que a toxina tem maior tempo de permanência, candidatos a órgãos alvo.

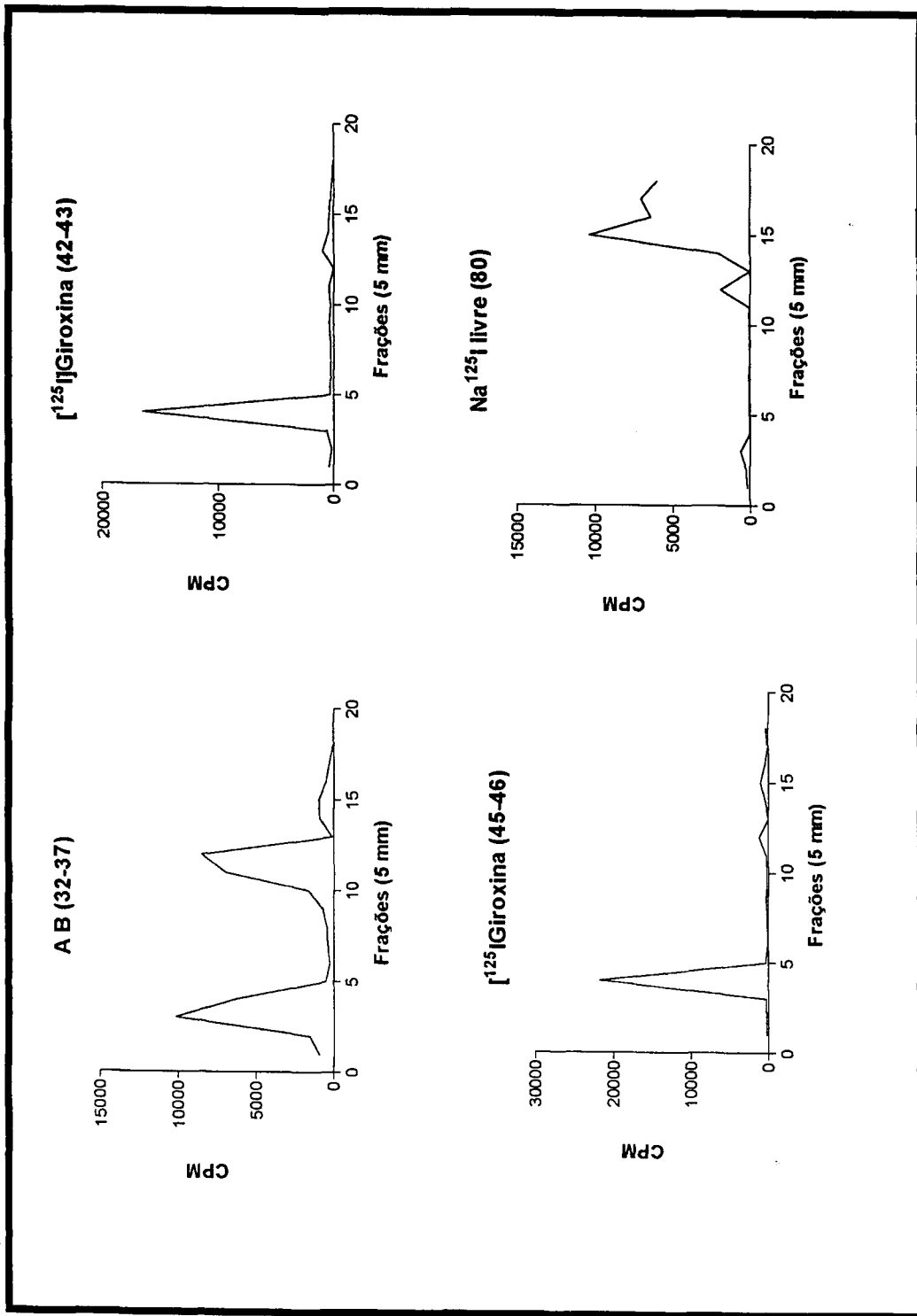


FIGURA 15. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, sistema descontínuo de tampões; com SDS. Análise dos picos identificados no fracionamento da mistura de radioiodação da gioxina (FIGURA 4). Cada fração do gel corresponde a 5 mm (eixo X).

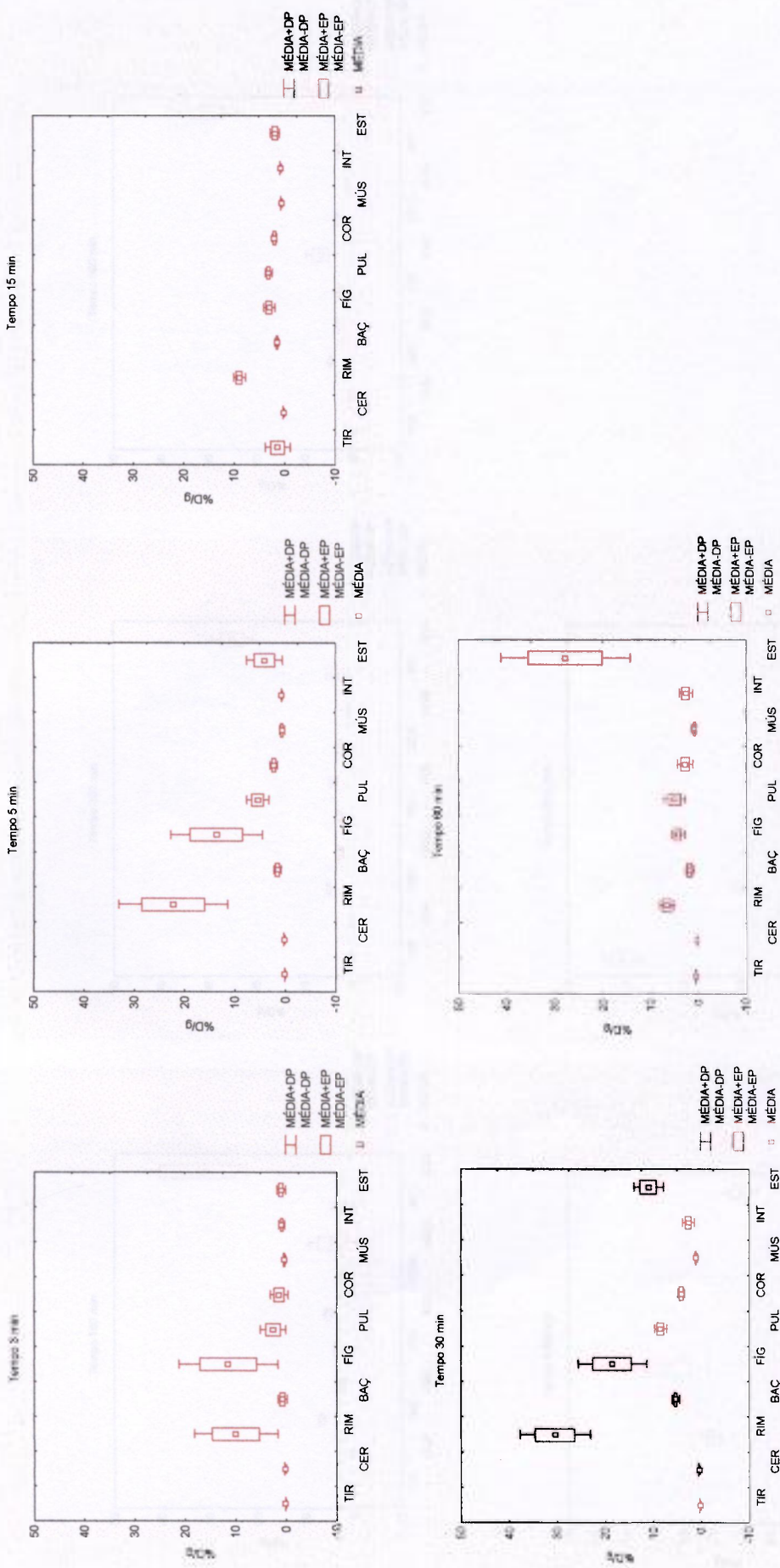


FIGURA 16. Atividade média, desvio padrão e erro padrão nos diferentes órgãos nos diferentes intervalos de tempo.

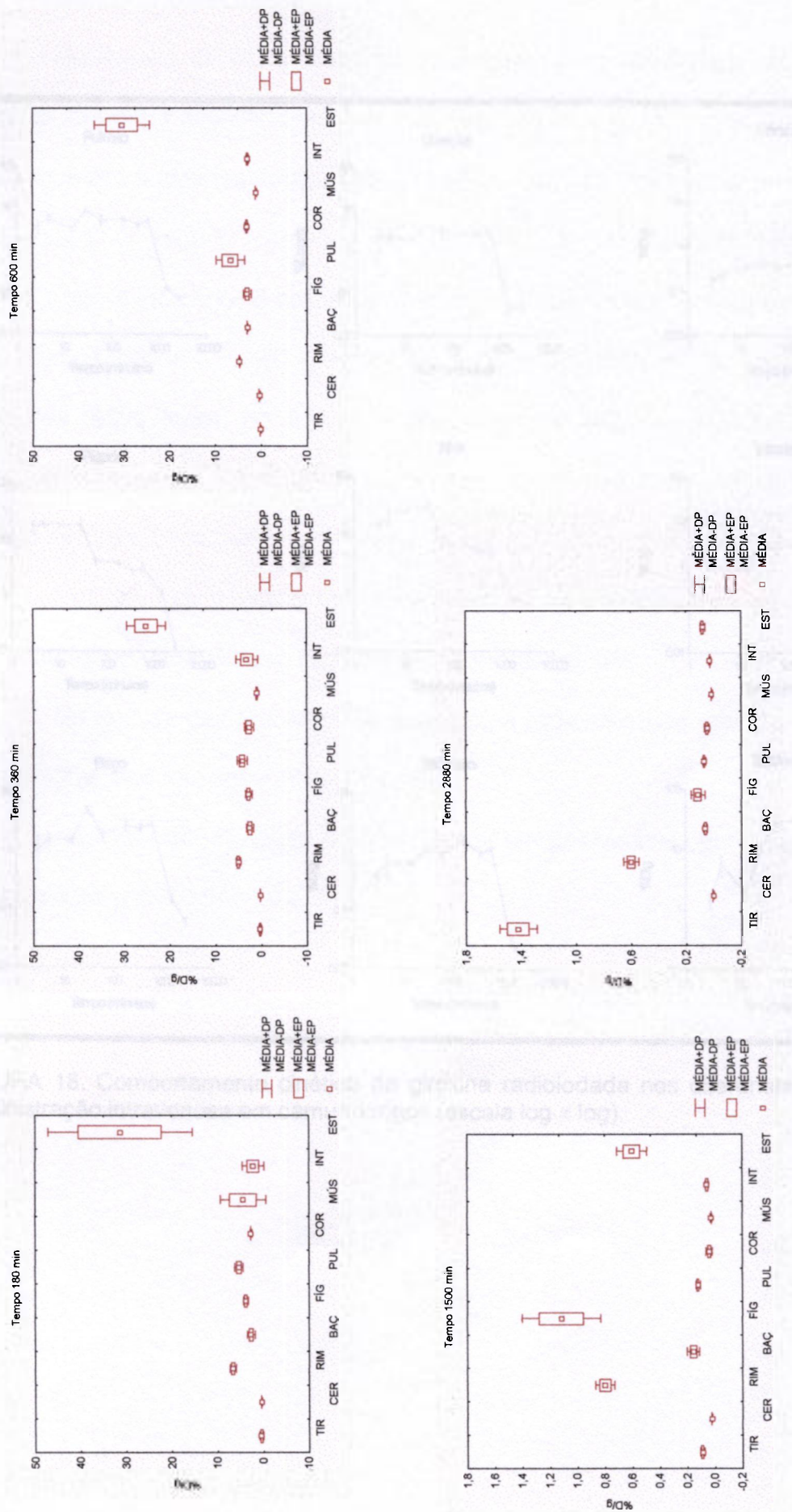


FIGURA 17. Atividade média, desvio padrão e erro padrão nos diferentes órgãos nos diferentes intervalos de tempo.

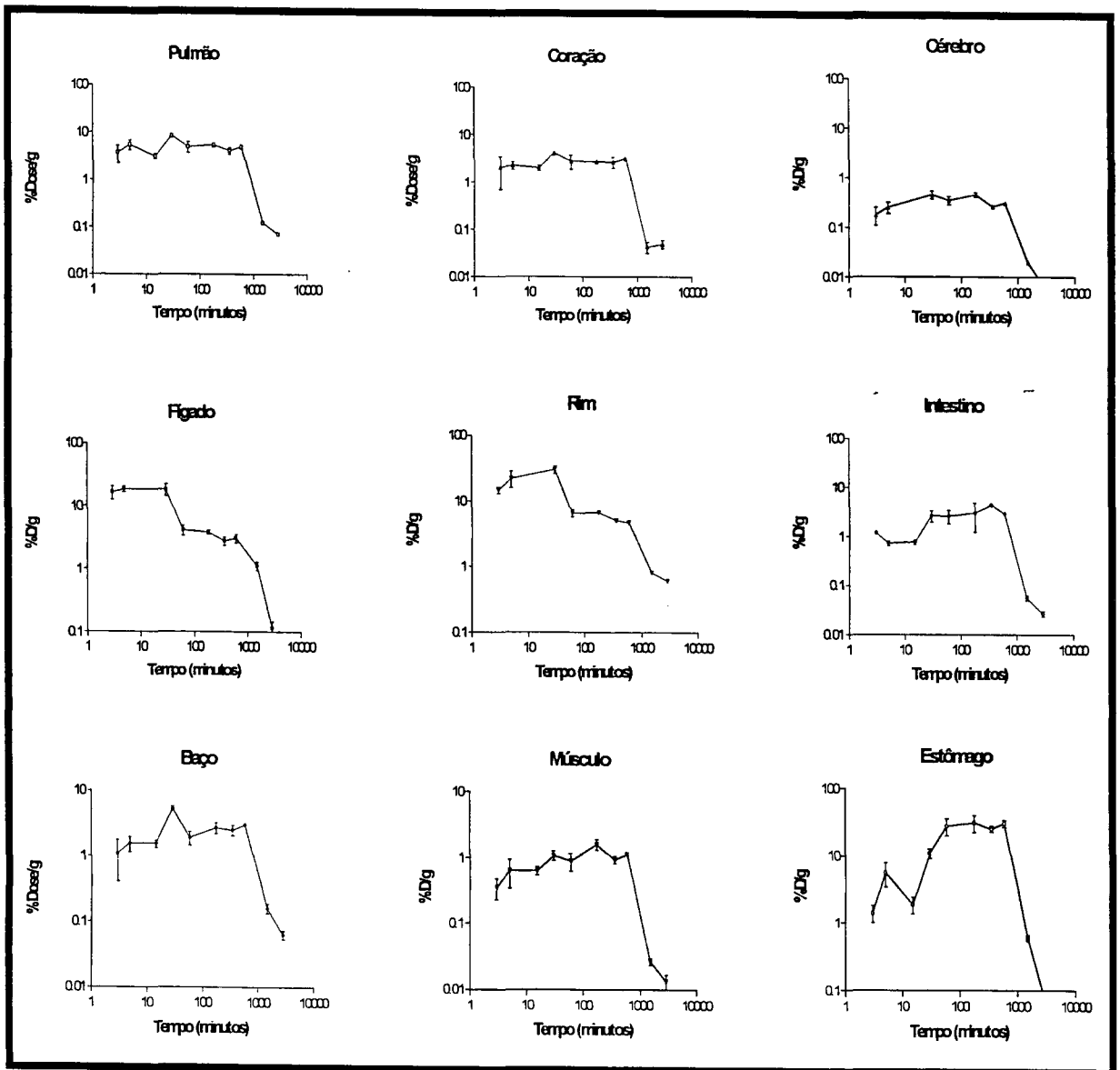


FIGURA 18. Comportamento cinético da gioxina radioiodada nos diferentes órgãos, após administração intravenosa em camundongos (escala log x log).

No ensaio de biodistribuição da giroxina a radioatividade detectada nos órgãos, permitiu diferenciá-los em três grandes grupos. O primeiro com órgãos que repetem a cinética sanguínea – pulmão, coração (altamente vascularizados) e cérebro. O segundo grupo com os órgãos de metabolismo e eliminação – fígado, rins e intestino. E um terceiro grupo em que se observou uma tendência a acumular a toxina – baço, músculo esquelético e estômago. Na primeira hora as maiores %D/g foram no fígado e rins; decaindo em seguida. Após 1 hora a concentração de [¹²⁵I]giroxina no estômago passou a subir permanecendo por longo período. Observando-se o perfil de radioatividade detectada no fígado e nos rins, cerca de quatro vezes maior que nos outros órgãos, pode-se inferir que a mesma tenha metabolismo hepático e eliminação renal.

Na análise das amostras sanguíneas, a radioatividade medida no plasma e no sangue total foi similar (FIGURA 19).

A baixa radioatividade na tireóide nos tempos iniciais confirma a pureza do radiotraçador (FIGURA 20).

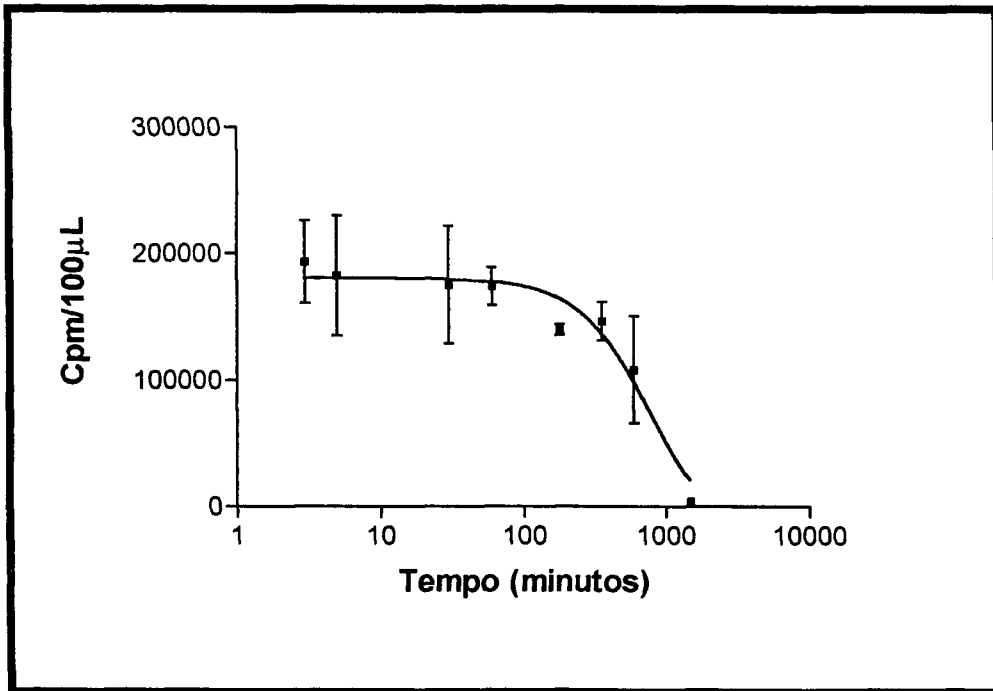


FIGURA 19. Gráfico dos valores de concentração do radio traçador/tempo para as amostras de sangue. As barras indicam o intervalo de confiança de 95%. A curva foi ajustada pelo modelo bicompartmental $C(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$.

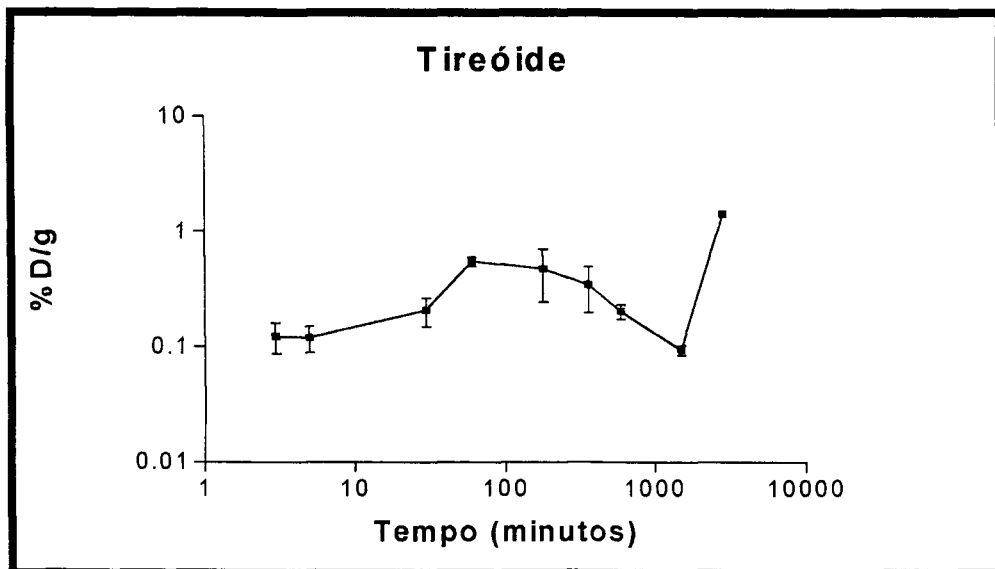


FIGURA 20. Incorporação do iodo na tireóide indicativo do metabolismo da $[^{125}\text{I}]$ gioxina.

5. DISCUSSÃO

O isolamento da gioxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é freqüentemente iniciado com uma gel filtração do veneno total e, em seguida, a utilização de uma coluna de afinidade (BERCOVICI *et al.*, 1987). Considerando-se que o veneno crotálico é pouco proteolítico, neste trabalho optou-se por uma inversão na ordem destas purificações. Esta abordagem pode ser considerada rápida, principalmente quando comparada ao método utilizado por BARRABIN *et al.* (1978); embora não tenha melhorado o rendimento. Um outro fator que deve ser ressaltado é que desta forma, é possível processar uma quantidade maior de veneno por partida, o que se torna uma vantagem devido à baixa concentração da gioxina no veneno total (2 a 3%) e evita as freqüentes diferenças de potências entre as preparações para a realização dos ensaios *in vivo*.

A atividade esterásica (BARRABIN *et al.*, 1978) e trombina símile (ALEXANDER *et al.*, 1988) estão associadas a gioxina. Por isso, as frações obtidas tanto da coluna em gel filtração quanto da afinidade foram submetidas ao teste com o substrato sintético TAME. Essas frações apresentaram forte atividade esterásica confirmando a presença e a atividade da gioxina nas duas etapas de purificação. Observou-se, porém que a gioxina liofilizada (SA) perde um pouco de sua atividade quando comparada à fração não liofilizada (AP2), provavelmente, devido às condições de congelamento e liofilização. Este fato foi relatado anteriormente por BARRABIN *et al.*, (1978).

Nas análises em eletroforese em gel de poliacrilamida as amostras resultantes da cromatografia de afinidade migraram como banda dupla o que pode ser devido à perda de partes do conteúdo glicosilado e, conseqüentemente modificação de sua massa molecular, ou ainda, a um processo de autólise. Os

valores de massa calculados por este método foram compatíveis com o obtido na análise em espectrometria de massa.

Esta análise também permite observar que em algumas purificações, na coluna de afinidade, o pico referente às proteínas não retidas ainda manteve a banda relacionada a giroxina, o que indica que a purificação da giroxina por esse método é muito sensível às condições da corrida, especialmente ao pH; e variações mínimas podem acarretar em perda de material. Para diminuir as perdas, pode-se passar uma mesma amostra pela coluna de afinidade mais de uma vez. No entanto, esta fase do trabalho foi concluída com os resultados esperados, ou seja, obteve-se a giroxina com grau de pureza e quantidade suficientes para os ensaios subsequentes e com todas as suas atividades biológicas características (rolamento em barril e coagulação).

O ensaio da medida da pressão arterial em ratos anestesiados confirmou uma potente ação hipotensora da giroxina.

Muitas serpentes utilizam-se de vários meios para induzir uma hipotensão rápida e acentuada em suas presas para imobilizar, capturar e matar (BJANARSON *et al.*, 1983), porém, considerando a alta toxicidade da crotoxina, principal toxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, este parece ser um efeito secundário promovido por um ou mais dos vários componentes do veneno, inclusive a giroxina.

Algumas enzimas trombina símile, como por exemplo, a TM-VIG purificada do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (HUNG & CHIOU, 2001) e a crotalase purificada do veneno de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND & DAMUS, 1971) promovem hipotensão em ratos, devido, principalmente, à sua atividade calicreína símile, liberando bradicinina (MARKLAND *et al.*, 1982; ESNOUF e

TUNNAH, 1967; HATTON, 1973) o que lhes atribui uma alta atividade hipotensiva. A ação hipotensiva comprovada *in vivo* (em ratos anestesiados) sugere uma possível aplicação terapêutica como agente anti-hipertensivo.

Como a gioxina, algumas outras enzimas trombina símile (MARKLAND, 1998; HUNG & CHIOU, 2001; OYAMA & TAKAHASHI, 2003) também promovem hipotensão, porém, ainda não se sabe ao certo qual a via utilizada para esta atividade.

Em relação a gioxina, cogitou-se que a via mais provável fosse a liberação de bradicinina diretamente através da clivagem do cininogênio de alto peso molecular devido a sua possível similaridade estrutural com outras trombinas símile e a sua atividade enzimática. No entanto, em estudos preliminares utilizando-se substratos sintéticos, observou-se neste trabalho que a gioxina não libera bradicinina (resultados não apresentados).

ASCHNER *et al.* (1997) determinaram que a bradicinina também contribui para o aumento da permeabilidade endotelial permitindo a passagem da albumina através das células arteriais pulmonárias bovina e mesmo que os resultados em relação a atividade caliceína símile tenham sido negativos, deve-se ressaltar que esse resultado é parcial e, principalmente, que foram testados apenas substratos sintéticos. Uma vez que os estudos realizados ainda não são conclusivos, a possibilidade de ser este o mecanismo que a gioxina utiliza para enviar os produtos de seus substratos endógenos para o tecido neural não pode ser descartada.

Por outro lado, a gioxina poderia liberar uma molécula relacionada ao seu efeito no sistema nervoso e efetora no relaxamento dos vasos que poderia ser o óxido nítrico.

Os ensaios com as células endoteliais em cultura comprovaram o envolvimento do óxido nítrico no mecanismo de ação desta toxina, envolvendo especialmente a i-NOS. Em condições fisiológicas o NO é um importante regulador do tônus vascular. A produção excessiva de NO, principalmente via i-NOS, pode ter um efeito citotóxico através da formação de peroxinitrito com superóxido (BUTTERY *et al.*, 1996). No entanto, nas condições deste ensaio, não foi possível observar danos nas células em cultura quando comparado com o grupo controle quanto com uma referência de um banco de células.

Esta observação foi corroborada por um teste de citotoxicidade em células CHO, em que doses de até 1mg/mL não foram suficientes para atingir a CT-50% (resultados não apresentados).

Os resultados do teste *in vivo* com inibidores sugerem que a n-NOS não tem participação na atividade da toxina já que não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o tratado com 7-Ni. Já a e-NOS parece ter participação na modulação da indução do rolamento em barril, pois a presença do L-NAME potencializou a ação da toxina. Resultado semelhante foi descrito por D'AMICO *et al.* (1995). Estes pesquisadores, ao investigarem o envolvimento da via L-arginina – óxido nítrico no rolamento em barril induzido por endotelina-1, observaram um aumento na capacidade em induzir o rolamento; assim sugeriram que o óxido nítrico atua como modulador do evento e de forma inibitória.

A ação inibitória do óxido nítrico na atividade da gioxina pode estar relacionada também ao seu papel neuroprotetor já discutido por outros autores (PONZONI *et al.*, 2000). Isso explicaria os efeitos intensificados da gioxina nos animais tratados com inibidores da e-NOS.

Com a determinação da atividade da NOS em células endoteliais ECV304 após tratamento com a gioxina, observou-se uma alta atividade da NOS no sistema, o que pode explicar sua atividade hipotensiva; deixando em aberto a questão do envolvimento do óxido nítrico no rolamento em barril. Estas células endoteliais não apresentaram alterações morfológicas perceptíveis quando comparadas ao controle e a outras culturas da mesma linhagem.

O óxido nítrico é um mensageiro com dupla ação que pode agir tanto no desenvolvimento celular, principalmente no sistema nervoso central, quanto na indução de apoptose (CONTESTABILE, 2000). Alguns autores relacionaram a atividade da NOS com a proliferação das células ECV304, após adição de fatores angiogênicos (SHIZUKUDA *et al.*, 1999). Isto não parece ocorrer com a adição da gioxina, assim como também não foi observada qualquer evidência de células em processo de apoptose. Estudos *in vitro* têm demonstrado os efeitos benéficos e tóxicos do óxido nítrico na sobrevivência dos neurônios (ESTEVEZ *et al.*, 1998; VIRGILI *et al.*, 1999; NUCCI *et al.*, 2003), porém, o papel do óxido nítrico em células de mamíferos parece estar longe de ser conclusivo. Esses efeitos são dependentes de vários fatores como a concentração de óxido nítrico, tipo ou linhagem das células em questão, molécula ou substância a ser analisada na ativação das diferentes isoformas da NOS, etc.

Os receptores de membrana protease-ativados (PARs) também podem estar envolvidos na capacidade da gioxina em induzir o rolamento. Sabe-se que através desses receptores, as serino proteases aumentam a permeabilidade das células endoteliais em cultura, liberando a passagem de diferentes moléculas para o meio intersticial (NGUYEN *et al.*, 1997); esses receptores também estão localizados no cérebro dos mamíferos (MACFALANE *et al.*, 2001); as mudanças

na permeabilidade da barreira hematoencefálica são respostas fisiológicas normais a vários eventos, tais como, variação no pH, variação na pressão arterial e no suprimento de nutrientes e oxigênio (YEPES *et al.*, 2003).

Além disso, a barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais, astrócitos e pela membrana vascular; se a gioxina atuar via receptores PAR e ocasionar aumento na permeabilidade endotelial, não só o produto de sua atividade enzimática, mas também outras moléculas poderiam alcançar as células neuronais.

Na verdade, existem vários caminhos possíveis que podem estar sendo utilizados pela gioxina para que os produtos de sua atividade enzimática ou até mesmo outras moléculas independentes de sua atividade alcancem os neurônios. Como, por exemplo, os sinais imunes do cérebro via corrente sangüínea podem ocorrer direta ou indiretamente. Células imunes como os monócitos, produzem um mensageiro químico chamado interleucina-1 (IL-1), normalmente incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Porém, vasos sangüíneos cerebrais têm junções porosas que permitem que as moléculas de IL-1 alcancem o cérebro. Lá elas podem ativar o eixo HPA (hipotálamo – hipófise – adrenal) e outros sistemas neurais, assim como se ligar a receptores nas células endoteliais que se alinham na parede dos vasos sangüíneos cerebrais. Essa ligação pode fazer com que as enzimas dentro das células produzam óxido nítrico ou prostaglandinas, que se difundem pelo cérebro e agem diretamente nos neurônios.

Alguns produtos químicos e vários peptídeos endógenos como endotelina-1, -3, arginina-vasopressina, losartan, endomorfina-1 (WURPEL *et al.*, 1986a; YOSHIZAWA *et al.*, 1990; DIAMANT *et al.*, 1994; KANNAN *et al.*, 1994; D'AMICO *et al.*, 1995; KAWACHI *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2004), também induzem o

rolamento em barril, no entanto, é importante lembrar que todas essas substâncias citadas apenas desencadeiam esta síndrome quando administradas via intracerebroventricular, diferentemente da gioxina que o faz também após administração via intraperitoneal ou intravenosa.

Vale lembrar que a trombina em doses até 2,5 vezes maiores do que a de gioxina não induz o rolamento em barril (ALEXANDER et al., 1988), o que estimula a busca pelo mecanismo específico com que algumas enzimas trombina símile induzem este comportamento neurotóxico.

No ensaio de marcação da gioxina obteve-se um radiotraçador com características adequadas para o ensaio de biodistribuição. Estudos anteriores validaram as condições suaves de marcação com cloramina T para esta toxina (CAMILLO et al., 1997).

Devido às características dos ensaios com radiotraçadores, a concentração de gioxina utilizada na biodistribuição é inferior a dose necessária para induzir o rolamento em barril. Assim, estes autores fizeram o controle da atividade biológica da gioxina, após a marcação, foi feita utilizando ^{127}I odo, com quantidades ponderáveis e mantendo as proporções estequiométricas da reação. Foram avaliadas as atividades amidásica e esterásica da toxina iodada comprovando a preservação de sua integridade.

Através do estudo de biodistribuição, buscou-se mapear a presença da gioxina em diferentes órgãos e relacionar estes dados com a presença ou não de receptores PAR, tendo como base dados da literatura.

Com base nos valores obtidos para %D/g nos órgãos em diferentes intervalos de tempo e segundo a primeira forma de análise (comparação das

contagem), foi possível diferenciar os órgãos em três grupos. Os órgãos de cada grupo foram, então, relacionados à distribuição dos receptores PAR.

TABELA 7. Distribuição tecidual dos receptores PAR.

PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
cérebro	próstata	coração	Pulmão
pulmão	intestino	rim	pâncreas
coração	cólon	pâncreas	testículos
estômago	fígado	timo	intestino
cólon	rim	intestino	placenta
rim	pâncreas	estômago	músculo
testículos	traquéia	linfonodos	esquelético
		traquéia	glândula-adrenal
			próstata
			útero
			cólon
			plaquetas
			megacariócitos

TABELA 8: Distribuição tecidual da [¹²⁵I]giroxina

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Grupo 1	cérebro coração pulmão		coração	pulmão
Grupo 2	rim	fígado rim intestino	rim intestino	intestino
Grupo 3	estômago		estômago	músculo-esquelético

Neste caso, observa-se que os grupos foram praticamente separados de acordo com a disposição dos receptores. Pode-se observar que o primeiro grupo está mais relacionado ao PAR-1 do que aos PAR-3 e -4. O segundo grupo está

mais relacionado ao PAR-2 do que aos PAR-1, -3 e -4. O terceiro grupo pode ser relacionado tanto ao PAR-4 quanto aos PAR-1 e PAR-3.

Os PAR-1, -2 são particularmente abundantes no trato gastrointestinal e, como observado na TABELA 8, podem ser os responsáveis pela alta concentração da [¹²⁵I]giroxina nesse sistema. O acúmulo progressivo no estômago pode ser devido tanto ao PAR-1 quanto ao PAR-3 que também está presente neste órgão.

O estudo da cinética na tireóide é um importante controle da concentração de iodo livre circulante durante o experimento de biodistribuição. A radioatividade detectada foi mínima e não apresentou um aumento linear com o tempo, conforme o esperado. Um aumento significativo foi medido apenas após 1500 minutos, o que pode ser devido ao acúmulo de ¹²⁵Iodo livre decorrente da degradação metabólica do marcado.

A atividade medida no plasma acompanhou a do sangue total, sugerindo que não há seletividade da toxina pelas células sangüíneas. A cinética no sangue não acompanhou o modelo mono nem o bicompartimental, nos tempos iniciais que refletem o comportamento da grande maioria dos compostos. A [¹²⁵I]giroxina permanece no sangue por um longo período. Este resultado não reproduz o observado anteriormente (CAMILLO *et al.*, 1997) e pode ser devido às diferentes linhagens de camundongos utilizados. Neste ensaio foi utilizada a linhagem B10.PL que é mais indicada para estudos imunológicos.

No cérebro, foram detectadas quantidades muito pequenas da [¹²⁵I]giroxina, cerca de 0,25 a 0,5% da dose e essa percentagem manteve-se estável durante quase todo o intervalo de tempo estudado, reproduzindo o comportamento no sangue. Isto pode indicar a pouca seletividade por esse órgão

e estaria de acordo com o proposto por CAMILLO *et al.* (2001) onde foi ressaltada a baixa capacidade da giroxina em atravessar a barreira hematoencefálica e sugerida a ocorrência de um composto intermediário para a manifestação dos seus efeitos neurotóxicos.

Assim, neste estudo foi feita uma primeira abordagem da possível interação da giroxina com os receptores PAR, presentes em diferentes órgãos. Estudos mais específicos são necessários para caracterizar a interação da giroxina com estes receptores e os efeitos decorrentes desta interação.

6. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido permitiu alcançar os objetivos propostos e concluir que:

- os métodos utilizados para isolar a gioxina do veneno crotálico foram adequados e permitiram processar maiores quantidades de veneno em cada lote e obter a gioxina em pureza adequada para o estudo;
- o teste *in vivo* permitiu registrar o rolamento em barril, confirmando a atividade da gioxina obtida;
- por espectrômetro de massa obteve-se a massa molecular da gioxina de 29506,63 kDa;
- o complexo heparina-antitrombina III não inibe a atividade trombina-símile da gioxina;
- o ensaio de pressão arterial comprovou que a gioxina do veneno crotálico é hipotensiva;
- o ensaio de determinação da atividade da óxido nítrico sintase demonstrou que a gioxina libera óxido nítrico em células endoteliais;
- os ensaios *in vivo* com inibidores da NOS demonstraram que o óxido nítrico participa da síndrome do rolamento em barril, porém não como mediador principal, podendo ter um papel modulatório/inibitório;
- a análise do ensaio de biodistribuição sugere que a gioxina tem metabolismo hepático e eliminação renal e que não atravessa a barreira hematoencefálica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H. & SCHWARTZMAN, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, v. 26, n.10, p. 953-960, 1988.
- ANDREWS, R.K.; GARDINER, E.E.; BERNDT, M.C. Snake venom toxins affecting platelet function. *Methods Mol Biol.* n. 273, p. 335-48. 2004.
- ASCHNER, J.L.; LUM, H.; FLETCHER, P.W.; MALIK, A.B. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J. Cell Physiol.* v. 173, n. 3, p. 387-396, 1997.
- BARRABIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSEMBERG, P. *Toxins: Animals, Plant and Microbial*. New York, USA, Pergamon Press, 1978. p. 113-133.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamer.*, v.11, p. 224, 1961.
- BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A.M.; DIAS, W.O.; ESTEVES, M.I.; HIRAIACHI, E.; OISHI, N.Y.; PICARELLI, Z.P.; ROCHA, M.C.; UEDA, C.M.P.M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem. Inst. Butantan.* v. 49 n. 3, p. 69-78. 1987.
- BJANARSON, J.B., BARISH, A., DIRENZO, G.S., CAMPBELL, R., FOX, J.W., Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* v. 258, 12566-12573. 1983.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dyue binding – **analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. 1976.
- BUCARETCHI, F.; HERRERA, S.R.F.; HYSLOP, S.; BACARAT, E.C.E.; VIEIRA, R.J. Snakebites by *Crotalus durissus terrificus ssp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Ver. Inst. Méd. Tro.** v. 44. n. 3, p. 133-138. 2002.
- BUTTERY, L.D.; SPRINGALL, D.R.; CHESTER, A.H.; EVANS, T.J.; STANDFIELD, E.N.; PARUMS, D.V.; YACOUB, M.H.; POLAK, J.M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. **Lab Invest**. v. 75, n. 1, p. 77-85. 1996.
- CAMILLO, M.A.P.; PAES, P.C.A.; RIBELA, M.T.C.P.; ROGERO, J.R. Purificação e radioiodação da giroxina (toxina semelhante á trombina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. In **4TH MEETING ON NUCLEAR APPLICATIONS**, 1997, Poços de Caldas, MG, 1997.
- CAMILLO, M. A. P.; ARRUDA PAES, P.C.; TRONCONE, L.R.P. & ROGERO, J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**. v. 39, p. 843-853, 2001.
- CASTRO, H.C.; SILVA, D.M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochim Biophys Acta**. v. 1547, n. 2, p. 183-95. 2001
- COLOMBETTI, L.G., Biological Transpor of Radiotracers. **Stritch School of Medicine. Maywood**, Illinois. 1982.
- CONTESTABILE, A. Role of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res. Rev**. v. 32, p. 476-509. 2000.
- COUGHLIN, S.; R. How the protease thrombin talks to cells. **Proc. Natl. Acad.**

- Sci.** v. 96, p. 11023-11027, 1999.
- D'AMICO, M.; BERRINO, L., MAIONE, S.; PIZZIRUSO, A.; ROSSI, F. Effects of L-NAME on endothelin-1-induced barrel-rolling in periaqueductal gray area of rats. **Life Sci.** v.57, PL357-PL360. 1995.
- DIAMANT, M.; BAARS, A.M.; KOVÁCX, G. L.; DE WIED, D. Barrel rotation induced by central arginine-vasopressin treatment: involvement of neurohypophyseal peptide receptors. **Pharm. Biochem. Behavior.** v. 47, p. 27-32, 1994.
- ESNOUF, M.P.; TUNNAH, G.W. The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Agkistrodon rhodostoma* venom. **Br. J. Haemat.** v.13, p. 581. 1967.
- ESTEVEZ, A.G.; SPEAR, N.; THOMPSON, J.A.; CORNWELL, T.L.; RADI, R.; BARBEITO, L.; BECKMAN, J.S. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci.** v. 18, p. 3708-3714. 1998.
- FERREIRO, C.R.; CHAGAS, A.C.; CARVALHO, M.H.; DANTAS, A.P.; SCAVONE, C.; SOUZA, L.C.; BUFFOLO, E.; DA LUZ, P.L. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. **Braz J Med Biol Res.** v. 37, n. 9, p. 1313-20. 2004.
- FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, 2001.
- GIBALDI, M. Compartmental and noncompartmental Pharmacokinetics. In: GIBALDI, M. **Biopharmaceuticals and Clinical Pharmacokinetics.** Philadelphia, PA. Lea & Febiger, 4 ed. p. 1-16. 1991.
- HATTON, M.W.C. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma*

- venom. **Biochem. J.** v. 131.799. 1973.
- HUANG, E.; CHEN, Y-K.; TAO, C-M.; P-L. Supraspinal anti-allodynic and rewarding effects of endomorphins in rats. **Peptides.** v. 25. p. 577-583. 2004.
- HUNG, C-C.; CHIOU, S-H. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan Habu: Serine proteases with kalikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 281. p. 1012-1018. 2001.
- IGNARRO, L.J. Endothelium derivated relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.** v. 61, p. 866-879, 1987.
- KANNAN, H.; TANAKA, H.; UETA, Y.; HAYASHIDA, Y.; KUNITAKE, T.; YAMASHITA, H. Effects of centrally administered endothelin-3 on renal symphathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. **J. Autonomic Nervous System.** v. 49, p. 105-113, 1994.
- KAWABATA, A.; KURODA, R. Protease-Activated Receptor (PAR), a Novel Family of G Protein-Coupled Seven Trans-membrane Domain Receptors: Activation Mechanisms and Physiological Roles. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 82, p. 171-174. 2000.
- KAWACHI, A.; MIYASHITA, M.; MOTOYA, T.; YAMADA, K. The angiotensin AT1 receptor antagonist, losartan, induces barrel rotation in the rat. **European Journal of Pharmacology.** v. 363. p. 103-106. 1998.
- KOH, Y.S; CHUNG, K.H; KIM, D.S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon.** v. 39, n. 4, p. 555-60. 2001.
- KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: SHIER;

- W.T.; MEBS, D. *Handbook of Toxicology*. New York, USA, Marcel Dekker Inc., p. 683-759. 1990.
- KOSAKO, T.; KAWACHI, A.; CHENG, S.B.; KUCHIWA, S.; MOTOYA, T.; NAKAGAWA, S.; YAMADA, K.; Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 454. p. 199-220. 2000.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-5, 1970.
- MACFALANE, S.R.; SEATTER, M.J.; KANKE, T.; HUNTER, G.D.; PLEVIN, R. Proteinase-Activated Receptors. **Pharmacol. Rew.** v.53, p. 245-282. 2001.
- MARKLAND, F.S.; DAMUS, P.S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). **J. Biol. Chem.** v. 246, p. 6460-6470. 1971.
- MARKLAND, F.S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S.S.; REDDY, K.N.N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G.B.; THEODOR, I.; PIRKLE, H. Kallikrein-like action of a fibrinogen clotting snake venom enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.79, p.1688,1982.
- MARKLAND, F.S. Snake venom and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800. 1998.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemical et Biophysica Acta**. v. 1477, p. 146-156. 2000.
- MONCADA, S. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

- NGUYEN, L.T.; LUM, H.; TERUPPATHI, C.; MALIK, A.B. Site-specific thrombin receptor antibodies inhibit Ca²⁺ signaling and increased endothelial permeability. **Am. J. Physiol.** v. 273, n. 5 Pt 1, p. C1756-63. 1997.
- NOLAN, C.; HALL, L.S.; BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulating enzyme of Malayan pitviper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods in Enzimology**, v. 45, p. 205-213. 1976.
- NUCCI, C.; PICCIRILLI, S.; NISTICO, R.; MORRONE, L.A.; CERULLI, L.; BAGETTA, G. Apoptosis in the mechanisms of neuronal plasticity in the developing visual system. **Eur. J. Ophthalmol.** p. 13 (Suppl. 3), p. S36-S43. 2003.
- OYAMA E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**. v. 41. n.5 p. 559-68. 2003.
- OUYANG, C.; TENG, C.H.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, n.9, p. 945-966, 1992.
- PIRKLE, H.; THEODOR, I.; MIYADA, D.; SIMMONS, G. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. **J Biol. Chem.** v. 5, n. 261(19), p. 8830-5. 1986.
- PONZONI, S.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A.; GARCIA-CARRASCO, N. Behavioral effect of intra-nigral microinjections of manganese chloride: interaction with nitric oxide. **Neuro-psychopharmacol & Biol. Psychiat.** v. 24. p. 307-325. 2000.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 5º ed, Brasil, Elsevier,

2004, p.904.

- RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 19, p. 333-338, 1986.
- RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P; BARRET, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem J.** v. 15, n. 378(Pt 3), p. 705-16. 2004.
- SELISTRE, H.S.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon.** v. 25, n. 11, p.1135-44. 1987
- SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2ª Edição. São Paulo. Brasil. 1992.
- SHIZUKUDA, Y.; TANG, S.; R.; YOKOTA, J.; WARE, A.; Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Endothelial Cell Migration and Proliferation Depend on a Nitric Oxide–Mediated Decrease in Protein Kinase C δ Activity. **Circulation Research.** v. 85, p. 247-256. 1999.
- SUO, Z.; CITRON, B.A.; FESTOFF, B.W. Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** v. 3. p. 105-14. 2004.
- TEIXEIRA, C.E. Papel do óxido nítrico na ereção peniana. Envolvimento de fibras nitrérgicas e do endotélio. 2001. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TURGEON, V.L.; HOUENOU, L.J. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. **Brain Res. Rev.** v. 25. p. 85-95. 1997.
- VIRGILI, M.; MONTI, B.; LORUSSO, A.; BENTIVOGLI, M.; CONTESTABILE, A.

Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. **Brain Res.** v. 839, p. 164-172. 1999.

WURPEL, J.D.; DUNDORE, R.L.; BARBELLA, Y.R.; BALABAN, C.D.; KEIL, L.C.; SEVERS, W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. I. Description and general pharmacology. **Brain Res.**, v.365, p.21-29, 1986a.

XU, Y.; KRUCOFF, T.L. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. **Regulatory peptides.** v. 119, p. 21-30. 2004.

YEPES, M., SANDKVIST, M., MOORE, E., G., BUGGE, T., H., STRICKLAND, D., K., LAWRENCE, D., A. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 112. N. 10. p. 1533-1540. 2003.

YOSHIZAWA, T.; SHINMI, O.; GIAID, A.; YANAGISAWA, M.; GIBSON, S.J.; KIMURA, S.; UCHIYAMA, Y.; POLAK, J.M.; MASAKI, T.; KANAZAWA, I. Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. **Science**, v.247, p. 462-464, 1990.

ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ, J.M.; MUSCARA, M.N.; TEIXEIRA, S.A.; TEIXEIRA, C.F. Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon.** v. 39, n.10, p.1505-13. 2001.