

ASPECTOS DA BIODISTRIBUIÇÃO DA GIROXINA (ENZIMA SEMELHANTE À TROMBINA) DO VENENO DA CASCAVEL BRASILEIRA, *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*.

Paulo Cesar de Arruda Paes, José Roberto Rogero e Maria Aparecida P. Camillo
Divisão de Radiobiologia - TBR

OBJETIVO

O presente trabalho é uma continuidade dos estudos da giroxina do veneno da cascavel brasileira, *Crotalus durissus terrificus*, cujas etapas anteriores foram o estudo da atividade trombina-símile e a radioiodação [1] e [2].

As enzimas semelhantes à trombina são largamente encontradas nos venenos ofídicos e possuem importante indicação terapêutica para problemas trombovasculares. No entanto, parece estar associado a elas uma síndrome neurotóxica denominada "rolamento em barril", cujo mecanismo de ação é desconhecido. O presente trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento da biodistribuição da giroxina e de seus possíveis efeitos colaterais para permitir a elaboração de indicações clínicas mais seguras.

METODOLOGIA

Reação de radioiodação.

A marcação foi feita com 26 MBq de Na¹²⁵I e 5 µg de giroxina, utilizando-se o método de cloramina T modificado [2]. Para a purificação do traçador foi utilizada uma coluna de Sephadex G.100 (2,3x50cm) eluída com tampão fosfato 50 mM contendo 0,1% de soro albumina bovina. A pureza do marcado foi avaliada por eletroforese em gel de poli-acrilamida 15%, não reduzido, e sistema descontínuo de tampões [2,3].

Estudo cinético da toxina marcada.

⇒ Medidas no sangue: Camundongos, Swiss, machos, pesando entre 28-32 g. receberam pela via intravenosa, na cauda,

3,2x10⁶ cpm da toxina marcada. Amostras de sangue (50 µL) foram coletadas pela via retro-orbital entre 0,02 e 18,5 h. As contagens foram expressas como cpm/mL e ajustadas pelo modelo bicompartimental [4]. Amostras de sangue idênticas às descritas acima foram analisadas em SDS-PAGE; os resultados foram expressos como porcentagem de cada pico em relação às contagens (cpm) totais.

⇒ Medidas na tireóide e no cérebro. O esquema experimental utilizado foi semelhante ao descrito acima. Os animais foram sacrificados após 1, 3 ou 10 minutos após a injeção. Foram retirados a tireóide e o cérebro para determinação da radioatividade incorporada. Os resultados foram expressos como a média das porcentagens das contagens ou esta porcentagem por grama de tecido.

⇒ Medidas na urina e nas fezes. O esquema experimental utilizado foi semelhante ao descrito acima, sendo que os animais foram distribuídos individualmente em gaiolas metabólicas. As amostras de urinas e fezes foram coletadas durante 7 horas e os resultados expressos como porcentagem do total injetado.

RESULTADOS

Os parâmetros de avaliação da marcação (recuperação: 80%; rendimento: 46% e atividade específica: 2,5 MBq/µg) indicam que o método utilizado foi adequado para a preparação do traçador. A análise eletroforética permitiu comprovar a pureza de 95% da giroxina marcada, praticamente isenta de formas agregadas e iodo livre.

No estudo cinético da toxina marcada, o ajuste bicompartimental para as medidas no sangue seguiram a equação $C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, que propõe a distribuição da toxina em um compartimento central e um periférico. Os parâmetros calculados estão na Tabela 1.

Tabela 1. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para [125 I]giroxina crotática

PARÂMETROS	VALORES	
Dose injetada (I.V.)	$3,2 \times 10^6$	cpm
A	410500	cpm/min.mL
α	4,460	h^{-1}
B	161100	cpm/min.mL
β	0,2400	h^{-1}
$T_{1/2}$ (fase eliminação rápida)	0,1554	h
$T_{1/2}$ (fase de eliminação lenta)	2,888	h
C_0	571600	cpm/min.mL
V_c	5,60	mL
$K_{1,2}$	2,522	h^{-1}
$K_{2,1}$	1,429	h^{-1}
$K_{1,0}$	0,749	h^{-1}

A análise eletroforética das amostras sangüíneas (figura 1) mostrou que entre 1 e 30 minutos o pico referente à toxina nativa está presente, o que sugere que o efeito biológico não está relacionada à formação de metabólitos. Há ainda, uma pequena porcentagem da radiação que se liga a compostos de maior peso molecular, provavelmente à albumina sérica.

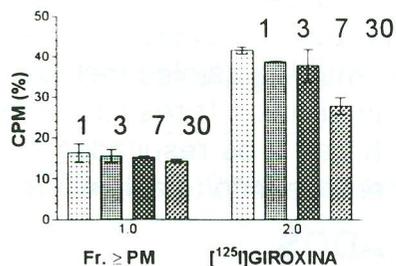


Figura 1. Análise eletroforética de amostras de sangue em 1, 3, 7 e 30 minutos. Resultados expressos como média e erro padrão das áreas dos picos de compostos de alto peso molecular e da [125 I]giroxina.

As porcentagens da radioatividade detectadas nas tireóides e nos cérebros decaíram com a depuração sangüínea (tabela 2) comprovando que a porcentagem

de iodo livre é desprezível e fornecendo evidências que a giroxina não atravessa a barreira hematoencefálica. Portanto, seu efeito neurotóxico ocorre de forma indireta e é, provavelmente, decorrente da atividade enzimática.

Tabela 2. Teste de incorporação da [125 I]giroxina

TEMPO	TIREOIDE (%)	CÉREBRO (%/g)
1 min.	0,19 +/- 0,09	1,45 +/- 0,56
3 min.	0,17 +/- 0,03	0,80 +/- 0,52
10 min.	0,13 +/- 0,05	0,51 +/- 0,23

A eliminação (ou excreção) da [125 I]giroxina foi de $98 \pm 2\%$ por via urinária.

CONCLUSÕES

A giroxina crotática foi rapidamente distribuída segundo um modelo bicompartimental, eliminada pela via urinária e forneceu evidências de não atravessar a barreira hematoencefálica ou sofrer metabolização rápida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]ARRUDAPAES,P.C.;CAMILLO,M.A.P.;ROGERO,J.R. **Comparação da atividade trombina-símile de toxinas dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Crotalus terrificus durissus***. II Seminário Anual PIBIC/IPEN(Livro Resumo), p.29-30, 1996.
- [2]ARRUDAPAES,P.C.;ROGERO,J.R. **Estudo da (radio)iodação da giroxina (enzima semelhante à trombina) do veneno de *Crotalus terrificus durissus***. III Seminário Anual PIBIC / IPEN(Livro Resumo), p.57-58, 1997.
- [3]LAEMMLI,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)**, v.227, p.680-685,1970.
- [4]MURPHY,C.A. **Manual de farmacocinética**. Tlalpan, México, SMMN/ALASBIMN, 1990, p.1-77.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq - PIBIC/IPEN