

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

MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASES
(PARs) EM ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GIROXINA

JOSÉ ALBERTO ALVES DA SILVA

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Pires
Camillo.

São Paulo

2009

Vítima, meu retrato saiu nos jornais. Disseram que sofri perda de substância.
De fato quebrei a cabeça, mas nunca soube que substância é essa. Sinto,
porém, que me faz muita falta - **Otto Lara Resende**

É um erro capital teorizar antes de ter os dados. Insensivelmente, começa-se
a distorcer os fatos para adaptá-los as teorias, em vez de fazer com que as
teorias se adaptem aos fatos – **Conan Doyle (1981)**

Nada é mais digno de nosso patrocínio que o fomento da ciência e da
literatura. O conhecimento é, em todo e qualquer país, a base mais segura da
felicidade pública – **Politicagens (1790)**

ANTITESE

Por que deveríamos subsidiar a curiosidade intelectual? - **Politicagens (1980)**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lindinalva, Luiz Coelho, José Alves e Maria que participaram de muitas etapas importantes em minha formação.

À minha família Luciana Alves, Joab Alves, Lucas Linco, Jean Linco e Renata por todo incentivo.

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

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Doutora Nanci do Nascimento por todo apoio.

À Doutora Olga Zazuco Higa pelo apoio e utilização de alguns equipamentos no laboratório.

À Doutora Lígia Ely Morganti F. Dias, pela utilização de aparelhos e materiais de seu grupo de estudo.

Ao Doutor Patrick Jack Spencer por toda ajuda e incentivo.

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

Ao Doutor Luis Gonzaga e a Mestre Bianca Zychar, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por disponibilizarem o laboratório nos experimentos de microscopia intravital.

Aos meus amigos Rubens Zanatta, Eduardo Moura, Murilo Casare, Vanessa, Larissa, Rosa, Sr. Longino, Dona G, Fernanda Calvo, Priscila Caproni, Jean Queiroz, Brito, Keli, Taís, Renata, Claudinha, Johnny, Camila Yonamine por toda amizade, ajuda e muitos momentos de descontração.

Às chocólatras Janaína e Karina Corleto que sempre me extorquiram em troca de discussões filosóficas sobre a vida acadêmica, a vida cotidiana e, também, a vida alheia! Agradeço por todas as broncas e gargalhadas espalhafatosas (preciso mencionar de quem?), foi um grande prazer tê-las por perto durante muitas etapas desse trabalho.

Devo um agradecimento especial à minha grande e estimada amiga Natália Malavasi por todo “sangue”, digo, apoio nos momentos finais desse trabalho, não teria conseguido sem você!

MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASES (PARs) EM ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GIROXINA

RESUMO

A giroxina é uma enzima serinoprotease do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*. É uma toxina apenas parcialmente caracterizada e com múltiplas atividades. Atua na coagulação, na diminuição da pressão arterial e induz um comportamento neurotóxico descrito como rolamento em barril. Os mecanismos envolvidos nestas atividades não são conhecidos. Considerando que a giroxina é uma enzima com alto potencial para ser um novo fármaco com aplicações em clínica médica como a trombina, tripsina, ancrod[®], batroxobin[®] e calicreína, é importante determinar como a giroxina atua. As análises em eletroforese em gel de poliacrilamida e dicroísmo circular confirmaram a pureza e integridade da molécula. A administração intravenosa em camundongos comprovou a neurotoxicidade (rolamento em barril). O estudo *in vivo* com microscopia intravital comprovou que a giroxina induz vasodilatação com participação dos receptores ativados por proteases (PARs), do óxido nítrico e da Na⁺K⁺ATPase. A adesão e rolamento de leucócitos indicaram que não possui atividade pró-inflamatória. A giroxina induziu a agregação plaquetária, que foi bloqueada pelos inibidores dos receptores PAR-1 e PAR-4 (SCH 79797 e tcY-NH₂, respectivamente). Finalmente, foi demonstrado que a giroxina alterou temporariamente a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Neste estudo foi comprovado que os receptores ativados por proteases e o óxido nítrico são mediadores envolvidos nas atividades biológicas da giroxina.

**PROTEASE ACTIVATED RECEPTORS (PARS) MEDIATION IN GYROXIN
BIOLOGICAL ACTIVITY
ABSTRACT**

Gyroxin is a serine protease enzyme from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom; it is only partially characterized and has multiple activities. Gyroxin induces blood coagulation, blood pressure decrease and a neurotoxic behavior named barrel rotation. The mechanisms involved in this neurotoxic activity are not known. Whereas gyroxin is a member of enzymes with high potential to become a new drug with clinical applications such as thrombin, batroxobin[®], ancrod[®], tripsyn and kallicrein, it is important to find out how gyroxin works. The analysis on agarose gel electrophoresis and circular dichroism confirmed the molecules' integrity and purity. The gyroxin intravenous administration in mice proved its neurotoxicity (barrel rotation). In vivo studies employing intravital microscopy proved that gyroxin induces vasodilation with the participation of protease activated receptors (PARs), nitric oxide and Na⁺K⁺ATPase. The leukocytes' adherence and rolling counting indicated that gyroxin has no pro-inflammatory activity. Gyroxin induced platelet aggregation, which was blocked by inhibitors of PAR1 and PAR4 receptors (SCH 79797 and tcY-NH₂, respectively). Finally, it was proved that the gyroxin temporarily alter the permeability of the blood brain barrier (BBB). Our study has shown that both the protease-activated receptors and nitric oxide are mediators involved in the biological activities of gyroxin.

LISTA DAS ABREVIações

μ (micro)	–	fator de multiplicação 10^{-6}
5-HT	–	5-hidroxitriptamina (ou serotonina)
5-HT1	–	receptor de 5-hidroxitriptamina
Acet	–	acetilcolina
ADP	–	difosfato de adenosina
AMP	–	adenosina-5'-monofosfato
Ang II	–	angiotensina II
Arg	–	arginina, símbolo R
Asp	–	ácido aspártico, símbolo D
BAPNA	–	N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
B Max	–	agregação máxima obtida no ensaio com plaquetas
BHE	–	barreira hematoencefálica
CAM	–	molécula de adesão molecular
cAMP	–	adenosina monofosfato cíclica
cGMP	–	guanosina monofosfato cíclica
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	–	dimetilsulfóxido
DNA	–	ácido desoxirribonucléico
EDHF	–	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	–	fator relaxante derivado do endotélio
EDTA	–	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	–	ácido etilenoglicoltetracético
eNOS	–	óxido nítrico sintase endotelial
ET-3 e -1	–	endotelina-3 e endotelina-1
ETB	–	receptor de endotelina B
FAD	–	flavina adenina dinucleotídeo
GPIb-IX-V	–	glicoproteína Ib – IX – V
GPIIb/IIIa	–	glicoproteína IIb/IIIa
HCl	–	ácido Clorídrico
HEPES	–	ácido 2-[4-(2-hidroetil)-1-piperazinil]etanosulfônico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM1 – molécula de adesão intercelular1
IK – canais de potássio de condutância intermediária ativados por cálcio
IL6; IL8 – interleucina 6; interleucina 8
IP3 – trifosfato de inositol
KCl – cloreto de potássio
kDa – quilodalton
L-NAME – L-NG-nitro arginina metil ester
MCP-1 – proteína quimiotático de monócito 1
NaCl – cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – dihidrogeno fosfato de sódio
NaHCO₃ – hidrogenocarbonato de sódio
Na⁺, K⁺ ATPase – sódio, potássio ATPase
nm – nanômetro
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
PAI-1 – inibidor do ativador de plasminogênio
PAB – p-Aminobenzamidine
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PAR – receptores ativados por proteases
PBS – tampão salina fosfato
PGF2 – prostaglandina F2
PGI2 - prostaciclina I2
PIP2 – fosfatidil inositol bifosfato
PLA2 – fosfolipase A2
PL – plaqueta lavada
PLC – fosfolipase C
PMSF - fenil metil sulfonil fluorido
PRP – plasma rico em plaquetas
SAB – soro albumina bovina

SCH 79797 – (N3-ciclopropil-7-{{4-(1-metilfenil)fenil}metil}-7H-pyrrolo(3, 2-f)quinazolina-1,3-diamina dihidroclorido

SDS	–	dodecil sulfato de sódio
Ser	–	serina, símbolo S
SK	–	canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio
SVSP	-	Serinoproteases derivadas do veneno de serpentes
TAME	–	tosil-arginina-metilester
TCA	–	ácido tricloroacético
TACK	–	tosil-arginina-clorometil-cetona
tcY-NH₂	–	trans- cinnamoyl-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH ₂
TEMED	–	N,N,N',N', tetrametil 1,2 diamino
TRIS	–	hidroximetil aminometano
Tro	–	trombina
TXA₂	-	tromboxano A ₂
VCAM1	–	molécula de adesão vascular
VEGF	–	fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. 1. Giroxina e os receptores ativados por proteases	12
3. 2. Serinoproteases do veneno de serpentes.....	20
3. 3. Serinoproteases, tônus vascular e barreira hematoencefálica	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4. 1. Reagentes	26
4. 2. Animais	26
4. 3. Obtenção da giroxina	26
4. 4. Concentração protéica.....	27
4. 5. Teste da atividade <i>in vivo</i>	28
4. 6. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	28
4. 7. Análise por dicroísmo circular.....	30
4. 8. Análise por microscopia intravital	31
4. 8. 1. Adequação do equipamento	31
4. 8. 2. Procedimento experimental	33
4. 8. 3. Análise estatística	36
4. 8. 4. Rolamento e adesão de leucócitos	36
4. 8. 5. Análise estatística	37
4. 9. Agregação plaquetária em microplacas.....	37
4. 9. 1. Obtenção do plasma rico em plaquetas	37
4. 9. 2. Agregação plaquetária - giroxina	38
4. 9. 3. Agregação plaquetária - inibidores.....	39
4. 9. 4. Análise estatística	39
4. 10. Permeabilidade da barreira hematoencefálica	40
4. 10. 1. Padronização do ensaio.....	41
4. 10. 2. Permeabilidade da barreira hematoencefálica - giroxina	42
4. 10. 3. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5. 1. Obtenção da giroxina	43

5. 2. Concentração protéica.....	43
5. 3. Teste de atividade <i>in vivo</i>	43
5. 4. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	45
5. 5. Análise por dicroísmo circular.....	45
5. 6. Análise por microscopia intravital.....	46
5. 7. Rolamento e adesão de leucócitos	51
5. 8. Agregação plaquetária em microplacas	54
5. 9. Permeabilidade da barreira hematoencefálica	57
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A giroxina é uma neurotoxina do veneno da cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus* e representa 2,5% do veneno total dessa espécie. Essa toxina foi parcialmente caracterizada em 1961 por Barrio *et al.* esses autores a descreveram como uma toxina não letal responsável por induzir uma síndrome neurotóxica que se inicia como um quadro cataléptico seguido de movimentos giratórios desenvolvendo um comportamento semelhante ao rolar de um barril. A giroxina pertence à subfamília S1A das enzimas serinoproteases e tem caráter multifuncional – além de induzir o rolamento em barril, ela atua na pressão arterial e na coagulação do sangue.

A giroxina cliva o fibrinogênio na cadeia A α próximo ao N terminal (Alexander *et al.*, 1988), sendo, por isso, também denominada enzima trombina símile. As serinoproteases possuem serina, histidina e ácido aspártico na configuração espacial do centro catalítico. A serina é especificamente inativada com os fluorfosfato e fluorsulfatos orgânicos tais como o DFP e o PMSF. Estes inibidores reagem somente com a serina do sítio ativo formando um complexo inativo, diisopropilfosforil-enzima, que é estável. A denominação serinoproteases decorre desta reação específica e, a inativação ocorre com tripsina, elastina, trombina e com as enzimas semelhantes à trombina isoladas dos venenos de serpentes (FERSHT, 1985).

As proteases representam cerca de 2% do genoma humano e, ao ativar os receptores ativados por proteases “PARs” (do inglês Protease-Activated Receptors), desempenham um papel importante em processos fisiológicos tais como a regulação do ciclo celular, processamento de antígenos, angiogênese e muitas delas atuam na pressão arterial. Elas também participam de processos patológicos como doença de Alzheimer, metástases e processos inflamatórios. O entendimento do mecanismo de ação destas enzimas em cada doença tem permitido intervenções terapêuticas e a utilização de inibidores específicos com bons prognósticos em casos de hipertensão, doenças cardíacas, algumas formas de câncer e viroses (HOOPER, 2002).

Os receptores ativados por proteases pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. A superfamília de receptores acoplados à proteína G é o maior e mais funcionalmente diverso grupo de moléculas sinalizadoras possibilitando

a atuação das proteases como moléculas sinalizadoras de forma similar a um hormônio (COUGHLIN^b, 2005).

Vários mecanismos atuam no controle e regulação da pressão arterial: mecanismos neurais, hormonais, intrínsecos da circulação e mecanismos rim-líquidos corporais (SHEPHERD, 1982; LARAGH, 1985; DAMPNEY, 1994). Neste estudo foram focados os fatores relacionados com o endotélio e a vasodilatação.

2 OBJETIVOS

Geral

Considerando este contexto, o desenvolvimento do presente trabalho tem por objetivo contribuir para estabelecer seu mecanismo de ação, pesquisando possíveis alvos (receptores e mediadores) envolvidos nestas atividades biológicas.

Específicos

- estudar a participação dos receptores ativados por proteases (PAR-1 e PAR-4) nas diversas respostas biológicas à ação desta toxina, utilizando modelo *in vivo* (microscopia intravital) e *in vitro* agregação plaquetária;

- verificar alterações na barreira hematoencefálica após injeção intravenosa de gioxina.

Vários são os **aspectos inéditos** deste trabalho:

- a forma de “olhar” a gioxina como uma proteína multifuncional, buscando caracterizar suas ações no tecido endotelial, em plaquetas e na barreira hematoencefálica;

- buscar estabelecer sua interação com receptores celulares e os mediadores envolvidos.

Como **contribuição** fica a possibilidade de utilizá-la no desenvolvimento de novos medicamentos para importantes doenças como esclerose e hipertensão

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os venenos das cascavéis sul-americanas se diferenciam das que habitam as Américas do Norte e Central por possuírem acentuadas características neurotóxicas, resultantes das diferentes composições dos venenos. Dois exemplos importantes são a crotoxina e a crotamina que representam, respectivamente, até 66% e 20% do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* (FIGURA 1).

A diversidade, assim como a especificidade na ação destas proteínas, é resultante do processo de seleção natural ocorrido ao longo da evolução. Estas propriedades fizeram com que, atualmente, os componentes isolados dos venenos animais sejam instrumentos valiosos nas pesquisas em fisiologia, patologia e desenvolvimento de novos medicamentos. Embora as toxinas sejam estudadas há décadas, ainda hoje são descritos novos aspectos de suas atividades e novas aplicações.

A proteína escolhida para este estudo ainda foi apenas parcialmente caracterizada e seu mecanismo de ação não é bem conhecido. Embora tenha sido isolada pela primeira vez por BARRABIN *et al.*, 1978, a sua presença no veneno de *Crotalus durissus terrificus* já havia sido relatada por BARRIO (1961) que a nomeou giroxina. Ainda que tenha utilizado apenas técnicas cromatográficas rudimentares, este autor isolou uma fração do veneno e a descreveu como uma neurotoxina não letal responsável por induzir uma síndrome neurológica que inicia com um quadro cataléptico seguido de movimentos giratórios. Em pequenas doses, o animal apresenta um tombamento lateral do corpo e o andar cambaleante. Em doses maiores, desenvolve um comportamento semelhante ao rolar de um barril; remetendo aos casos em que ocorrem lesões no labirinto.

BARRABIN *et al.* (1978) monitoraram as eluições das cromatografias, em diferentes etapas de purificação, com a absorvância em 280 nm e com medidas das atividades enzimáticas em diversos substratos, tais como lecitina, caseína, cálcio bis (p-nitrofenilfosfato); p-nitrofenilfosfato e tosil-arginina-metilester ou com os cofatores AMP e FAD. Estes autores observaram que a atividade esterásica acompanhava a giroxina em todos os perfis de eluição.



FIGURA 1. Distribuição geográfica da espécie *Crotalus durissus* (em vermelho). A foto à direita é de uma *Crotalus durissus terrificus*, subespécie encontrada apenas na região centro-sul da América do Sul, em regiões semi-áridas. O guizo no final da cauda é exclusivo das cascavéis (serpentes do gênero *Crotalus*).

Imagem da serpente obtida em <http://canalazultv.ig.com.br/galeria/993-l-cascavel-20582-72.jpg>; imagem do mapa obtida em YONAMINE, 2007.

Com a intenção de separar a proteína neurotóxica, responsável pelo giro, da enzima TAME-esterase, estes mesmos autores adicionaram um inibidor sintético tosil-arginina-clorometil-cetona (ou TACK, análogo ao TAME) à giroxina que isolaram. Este inibidor requer um ambiente específico no sítio de ligação do substrato (que determina a orientação da ligação do inibidor) e a presença de um resíduo de histidina, o qual é irreversivelmente modificado pelo grupo clorometilcetona do reagente. Com este experimento (BARRABIN *et al.*, 1978), verificaram que a atividade TAME-esterásica e o rolamento em barril foram irreversivelmente inativados pela reação com TACK em baixas concentrações (10^{-5} a 10^{-6} molL⁻¹).

Alguns trabalhos reforçam estas relações utilizando diferentes agentes que inativam rapidamente as duas atividades como, por exemplo, aquecimento da giroxina, 2-mercaptoetanol ou ditioneitol assim como a adição de outros inibidores específicos como PMSF (fluoreto de p-toluenosulfonila) e DFP (fluorofosfato diisopropila) (ALEXANDER *et al.*, 1988).

SEKI *et al.* (1980) desenvolveram uma nova estratégia para purificar a giroxina e tentar a sua separação da enzima TAME-esterase. Este objetivo pareceu ser parcialmente alcançado já que na presença de TACK 10^{-6} molL⁻¹ a giroxina ainda foi capaz de induzir o rolamento em barril (embora com uma dose três vezes maior do que o controle não tratado) mas a atividade enzimática foi suprimida. Na concentração de 10^{-5} molL⁻¹ e maiores do inibidor, as duas atividades foram abolidas.

Corroborando estes resultados, BERCOVICI *et al.* (1987) descreveram o isolamento de duas proteínas distintas no fracionamento do veneno crotálico, uma com atividade de giroxina e outra com atividade semelhante à trombina.

Um ano antes, RAW *et al.* (1986), haviam isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus* uma enzima trombina-símile, que ALEXANDER *et al.* (1988) demonstraram tratar-se da giroxina. Estes autores, utilizando pela primeira vez a cromatografia de afinidade com Benzamidina-Sepharose 6B para esta purificação, separaram duas proteínas:

- a primeira a eluir e presente em maior concentração (cerca de 2 mg/100mg de veneno total) apresentou alta atividade esterásica e pequena atividade trombina

- símile (evidenciadas pela clivagem de TAME, BAPNA E Cbz-Arg-PNA e coagulação do fibrinogênio humano e de carneiro);
- a segunda, de maior tempo de retenção e presente em menor concentração, possuía maior atividade coagulante e capacidade de induzir a rotação em barril.

As dúvidas sobre a pureza das preparações de giroxina foram esclarecidas quando MAGALHÃES *et al.* (1993) isolaram e seqüenciaram a enzima semelhante à trombina/análoga da giroxina do veneno de *Lachesis muta muta*; comprovando que as duas atividades, enzimática e neurotóxica, estavam presentes em uma mesma proteína - era uma das primeiras descrições da existência de proteínas multifuncionais.

Recentemente, foram descritas cinco seqüências de giroxina (FIGURA 2, provavelmente isoformas) obtidas por cDNA da glândula de veneno de um espécime de *Crotalus durissus terrificus* (YONAMINE *et al.*, 2009). Estas foram analisadas e comparadas com a seqüência parcial da giroxina (DA SILVA *et al.*, 1989) e com outras serinoproteases incluindo as serinoproteases de venenos. Todas as homologias obtidas foram superiores a 80% (YONAMINE, 2007).

```

Gyroxin-like B2.1 (Q58G94)
  1 viggdecnin ernflvalye ywsqsfllcg tlingewlt aahcdrkhiI iyvgvhdrsv
  61 qfdkeqrrfp kekyffncrn nftkwkdim lirlnkpsy sehiaplsI sspivgsvc
  121 rvmgwtiks pqtllpdvph caninlldyg vcrtahpqfr lpatsrilca gvleggidtc
  181 hrdsggplic ngefqqivsw gdgscaqpdK palyskvfdh ldwiqniIag setvncps

gyroxin-like B1_3 (EU360951.1)
  1 mvlirvlanI lilqlsyaqK sselviggde cninehnflv alyeywsqsf lcggtlinge
  61 wvItaahcdr thfllyvgvh drsvqfdkeq rrfpkekyff ncrnftkwd kdimlirlnk
  121 pvsyehiap lslpssppiv gsvcrvmgwG tikspqetlp dvphcaninI ldyevcrtah
  181 pqfrlpatsr ilcagvlegg idtchrdsG plicngefqg ivswgdgpca qpdKpalysk
  241 vfdhldwiqn iIagsetvnc ps

gyroxin-like B1_4 (EU360952.1)
  1 mvlirvlanI lilqlsyaqK sselviggde cninehnflv alyeywsqsf lcggtlinge
  61 wvItaahcdr thfllyvgvh drsvqfdkeq rrfpkekyff ncrnftkwd kdimlirlnk
  121 pvrnnehiaP lslpssppsv gsvcrvmgwG qttspqetlp dvphcaninI ldyevcrtah
  181 pqlrlpatsr ilcagvlegg idtchrdsG plicngefqg ivfwgpdca qpdKpalysk
  241 vfdhldwiqs iIagntivnc pp

gyroxin-like B1_7 (EU360954.1)
  1 mvlirvlanI lilqlsyaqK sselviggde cninehrlla ivytnssqca gtlingewl
  61 taahcdgenm diyIgvhnes vqydeegrV aaeKffclss rnytkwkdi mlirlnipvr
  121 nsthiaplsI pssppsvgsV crvmgwgtit spnetypdvp hcaninlfdy evclaaypef
  181 glpatsrtlc agiqqgkdt cgsdsGgsli cngqfqgivs wgdnpcaqph kpaIytkvid
  241 dtewiqsiia gntavtccp

```

FIGURA 2. Sequências de aminoácidos das enzimas giroxina símile. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>. O nome e número de referência no banco de dados identifica cada proteína. Na gyroxin-like B2-1 é apresentada apenas a sequência madura, já para as demais estão inclusos os aminoácidos do peptídeo sinal e do pro-peptídeo (identificados pelo retângulo laranja).

A síndrome do rolamento em barril ficou esquecida por muitos anos até que em 1975, COHN & COHN a introduziram nas neurociências. Após a observação deste comportamento pela administração intracerebroventricular de altas doses de somatostatina, esta síndrome foi então classificada como um efeito motor não usual, severo, associado à ação intracerebral de neuropeptídeos. Logo em seguida, KRUSE *et al.* (1977) observaram o mesmo efeito com a administração intracerebroventricular de arginina-vasopressina, o que motivou os autores a realizarem alguns estudos para entender melhor este quadro patológico e tentar definir seu local e mecanismo de ação.

Inúmeros outros trabalhos foram desenvolvidos para estudar este comportamento. Muitos, na tentativa de estabelecer um modelo animal para estudo de epilepsia humana e outros, para obter drogas anti-convulsivantes. Ainda hoje o rolamento em barril pode 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), podendo servir também como um modelo experimental das desordens do movimento humano (KAWACHI *et al.*, 1998).

A rotação em barril tem sido descrita como um aumento repentino e assimétrico no tônus do músculo esquelético, acompanhado por opistotonus, distorções espasmódicas e rotação ao longo do eixo do corpo (KRUSE *et al.*, 1977). Ocorre no sentido horário e anti-horário, no entanto, o mesmo rato gira sempre para o mesmo lado sendo que em apenas 3% dos casos ocorrem exceções (WURPEL *et al.*, 1986). Os rolamentos se alternam com períodos de prostração e o retorno ao comportamento rotacional pode ser estimulado por ruídos ou com o pinçar da cauda sendo que nestes casos pode ocorrer o aumento do rolamento (COHN & COHN, 1975).

Alguns ratos morrem, em geral por dificuldades respiratórias, enquanto outros ficam completamente assintomáticos em aproximadamente 1 hora. Muitos ratos que não desenvolveram a rotação em barril podem apresentar um ou mais dos seguintes sintomas: imobilidade, ataxia e extensão dos membros posteriores.

Outras características importantes do rolamento em barril que também são observadas são:

- é um fenômeno tudo ou nada, não apresentando relação dose x resposta (WURPEL *et al.*,1986a);
- e sofre sensibilização - uma segunda injeção de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular induziu o rolamento em barril em um número maior de ratos e causou uma diminuição do tempo de latência em relação ao primeiro dia (WURPEL *et al.*,1986b; WILLCOX *et al.*,1992).

Outros agentes de estímulo e estruturas específicas do sistema nervoso central continuam sendo estudados visando se estabelecer os receptores e/ou mediadores envolvidos no desencadeamento desta síndrome (KOZAKO *et al.*, 2000; LOSADA *et al.*, 2004; TORRENT *et al.*, 2007).

Aqui cabe salientar que muitos compostos são capazes de induzir a síndrome do rolamento em barril quando administrados diretamente no tecido nervoso e apenas poucas proteínas isoladas de venenos de serpentes são capazes de iniciar o rolamento após administração via intravenosa, são elas - giroxina de *Crotalus durissus terrificus*, ancrod de *Agkistrodon rhodostoma*, crotalase de *Crotalus adamanteus* e giroxina símile de *Lachesis muta muta* (ALEXANDER *et al.*,1988; DA SILVA *et al.*,1989).

ALEXANDER *et al.* (1988) propõem que a capacidade de induzir o rolamento em barril está associada às atividades enzimáticas da giroxina, se correlacionando melhor com a atividade coagulante do que com a esterásica.

A possibilidade do envolvimento de um substrato endógeno ou liberação de um mediador responsável pela indução do rolamento em barril pode explicar por que uma segunda injeção intravenosa de giroxina, após curto intervalo de tempo da primeira dose, não é capaz de reproduzir o giro. Pode-se supor que ocorra um esgotamento do substrato ou do mediador e o tempo de latência seria necessário para nova síntese ou recaptura do mediador.

Outra observação que corrobora a hipótese da participação de um agente intermediário são os resultados de CAMILLO *et al.* (2001). Neste trabalho, verificou-se que o contato direto da giroxina com estruturas do sistema nervoso central (fatias de estriato) não alterou o perfil de liberação dos neurotransmissores dopamina e

acetilcolina neste tecido. As etapas fisiopatológicas e bioquímicas que desencadeiam o rolamento em barril ainda não são conhecidas. A hipótese que possui mais adeptos supõe a liberação de formas ativas por ação enzimática sobre substratos endógenos inativos.

O dendrograma apresentado por YONAMINE *et al.* (2009), FIGURA 3, permite observar a similaridade das “isoformas” B1.3, B2.1 e B1.4 com a crotalase, ancrod e giroxina símile. Todas estão no mesmo grupo de atividade biológica (grupo I) e são as trombina símile que segundo ALEXANDER *et al.* (1988) também induzem o rolamento em barril.

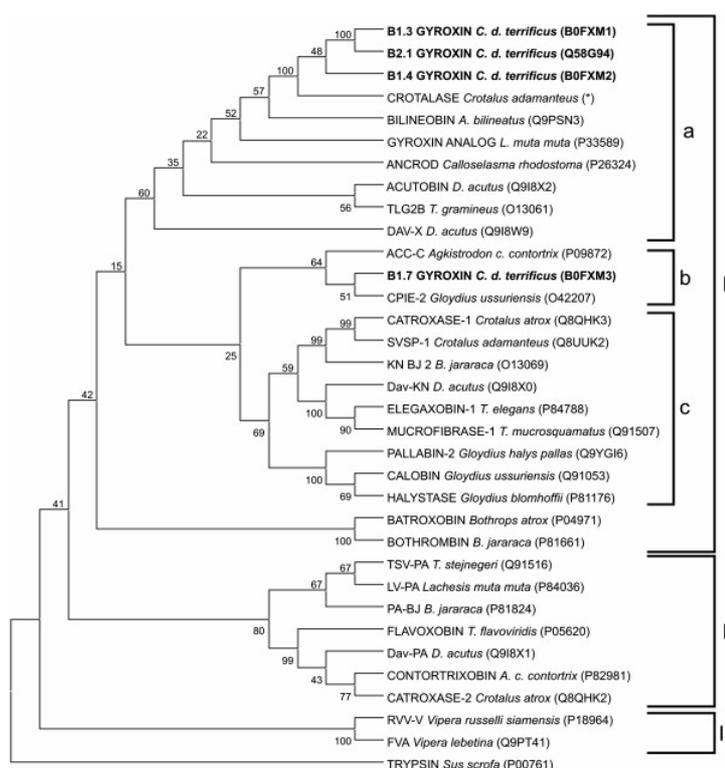


FIGURA 3. Dendrograma de 34 serinoproteases de serpentes, região madura (YONAMINE *et al.*, 2009). O nome da toxina é seguido pelo da espécie da serpente (em itálico) e entre parêntesis o número de acesso. As sequências prováveis da giroxina estão destacadas em negro.

O grupo I é dividido em três subgrupos. As toxinas maduras codificadas por homólogos B2.1, B1.3, B1.4 pertencem ao subgrupo Ia que contém enzimas de coagulação que convertem o fibrinogênio em um coágulo de fibrina. Essas toxinas são caracterizadas por serem fibrinogenases Aa altamente glicosiladas.

O peptídeo maduro identificado como B1.7 pertence ao subgrupo Ib cujos membros apresentam atividades como aumento da permeabilidade capilar e prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada devido à degradação proteolítica dos fatores Va e VIIIa (STOKER *et al.*, 1987). O subgrupo Ic compreende cininogenases que provocam um efeito hipotensor acentuado (SERRANO *et al.*, 1998). O grupo II engloba ativadores de plasminogênio e contém a toxina TSV-PA, que facilitam a solubilização de coágulos de fibrina. O grupo III é relacionado aos fatores ativadores do fator Va, imitando a atividade da trombina.

Estas toxinas também possuem serina, histidina e ácido aspártico na configuração espacial do centro catalítico (FIGURA 4). A serina é especificamente inativada com os fluorfosfato e fluorsulfatos orgânicos tais como o DFP e o PMSF. Estes inibidores reagem somente com a serina do sítio ativo formando um complexo inativo, diisopropilfosforil-enzima, que é estável. A denominação serinoproteases decorre desta reação específica e, a inativação ocorre com tripsina, elastina, trombina e com as enzimas semelhantes à trombina isoladas dos venenos de serpentes (FERSHT,1985). Aqui cabe esclarecer que as SVSP que clivam o fibrinogênio são inseridas em um subgrupo denominado enzimas semelhantes à trombina ou trombina símileis.

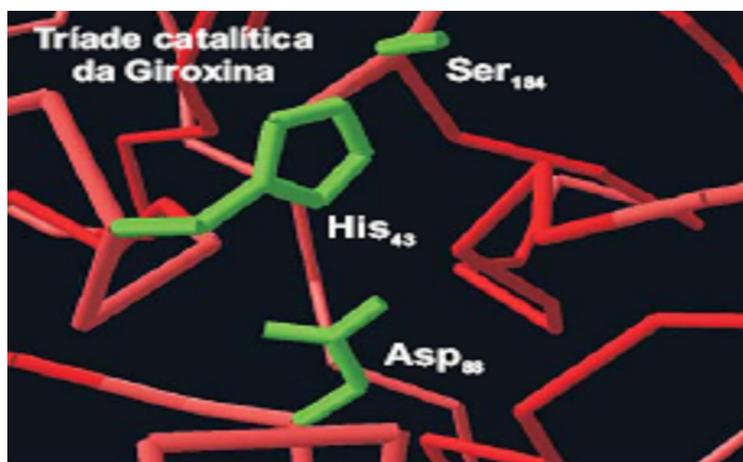


FIGURA 4. Modelo da tríade catalítica da gioxina (Serina 184, Histidina 43 e Ácido Aspártico 83) (YONAMINE, 2007).

Cada aminoácido da tríade executa uma tarefa específica na reação enzimática. A serina tem o grupo-OH que atua como um nucleófilo, atacando o grupamento carbonila e cortando a ligação peptídica. O nitrogênio da histidina, por possuir um par de elétrons livres, tem a capacidade de aceitar o hidrogênio do grupo-OH da serina, coordenando o ataque à ligação peptídica. O grupo carboxílico do ácido aspártico interage com o hidrogênio da histidina, tornando o nitrogênio acima mencionado muito mais eletronegativo.

A atividade sobre o fibrinogênio humano é conhecida e comum às várias toxinas trombina símiles. A giroxina cliva o fibrinopeptídeo A da cadeia α próximo ao N-terminal (RAW *et al.*, 1986) e 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 não coagulação sangüínea parcial ou total observada em casos graves de pacientes picados pela cascavel pode ser decorrente do consumo do fibrinogênio (BUCARETCHI *et al.*, 2002).

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 e embolia pulmonar (MARKLAND, 1998). Algumas destas enzimas têm atividade caliceína símile e causam hipotensão como, por exemplo, a crotalase.

A homologia de 92% da estrutura primária entre a crotalase e a giroxina sugere que tenham atividades biológicas semelhantes, o que motivou a investigação de uma possível capacidade hipotensiva da giroxina (CASTRO *et al.*, 2001).

A comprovação foi obtida por ALVES DA SILVA (2004), que registrou uma queda longa e acentuada na pressão arterial de ratos tratados com giroxina. HASHIZUME & CAMILLO (2005) mediram o aumento de atividade da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) em células endoteliais em cultura, relacionando o aumento da liberação de óxido nítrico à hipotensão induzida pela giroxina.

3.1 Giroxina e os receptores PARs

Os receptores ativados por proteases pertencem à família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana (MISAKI *et al.*, 2006). A superfamília de receptores acoplados à proteína G é o maior grupo, além de ser o mais diversificado funcionalmente, de moléculas sinalizadoras (TABELA 1).

Alguns estudos demonstraram que a trombina, ao ativar o receptor PAR-1, alterou a permeabilidade das membranas de células endoteliais em cultura

(NGUYEN *et al.*, 1997) e aumentou a permeabilidade da BHE em ratos (GUAN *et al.*, 2004).

TABELA 1. Atividades e localização dos receptores ativados por proteases (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4).

ATIVIDADES	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Distribuição tecidual (análise em Northern blot)	Cérebro, pulmão, coração, estômago, cólon, rim, endotélio e testículos	Próstata, intestino médio, cólon, fígado, rim, pâncreas e traquéia	Coração, rim, pâncreas, timo, intestino grosso, estômago, linfonodos traquéia e endotélio	Pulmão, pâncreas, tireóide, testículos, intestino grosso, placenta, músculo esquelético, glândula adrenal, próstata, útero, cólon, plaquetas, endotélio 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

Fonte ALVES-DA-SILVA *et al.*, 2006.

Estes receptores desempenham um papel importante na regulação de muitos processos biológicos. Eles também são de grande importância clínica, pois já foi demonstrado que sua ausência ou superativação pode ocasionar vários distúrbios fisiológicos (WANG *et al.*, 2002).

Estudos de clonagem identificaram quatro membros deste grupo: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Os quatro estão presentes no endotélio e em diferentes tecidos, conforme já citado anteriormente e atuam na ativação de plaquetas, na regulação do tônus vascular entre outras atividades (KAWABATA & KURODA, 2000).

Estes receptores foram clonados primeiramente por dois grupos distintos, culminando na descoberta de um mecanismo diferente de ativação (FIGURA 5) de receptores celulares (RASMUSSEN *et al.*, 1991; VU *et al.*, 1991; COUGHLIN^b, 2005).

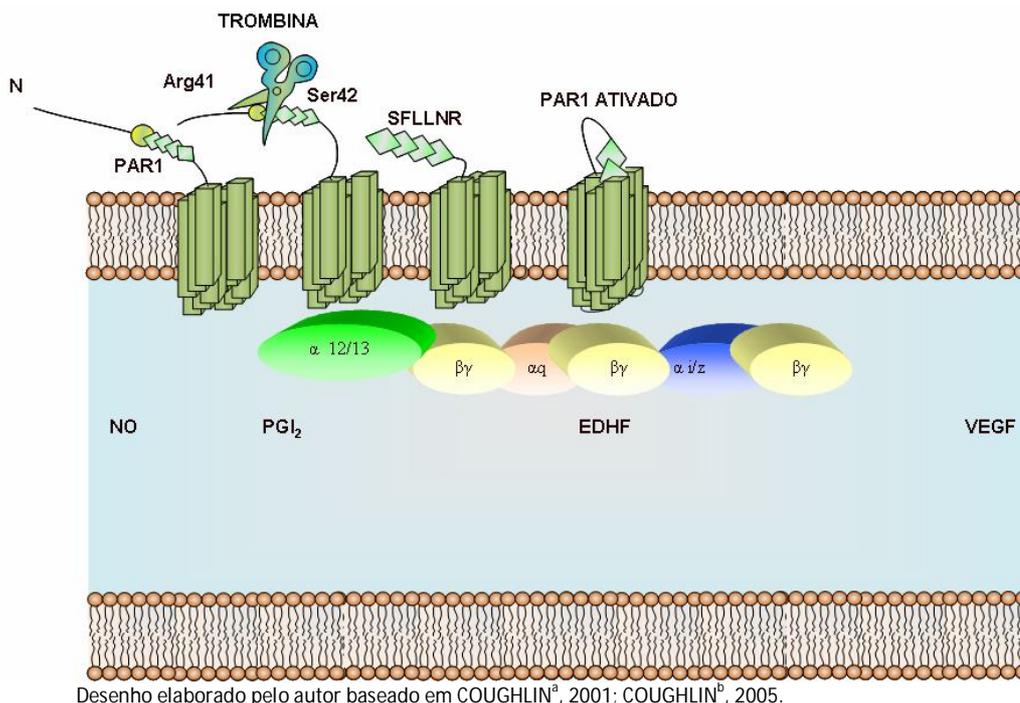


FIGURA 5. Representação esquemática da ativação do PAR-1 pela trombina e as alterações fisiológicas em células endoteliais. A trombina cliva o ligante atrelado ao PAR-1 entre a Arg41 e Ser42, em seguida o ligante é acoplado intramolecularmente no próprio receptor induzindo a liberação de fatores vasoativos como o NO, PGI₂, EDHF e VEGF.

NO - óxido nítrico; PGI₂ - Prostaciclina I₂; EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio; VEGF - fator de crescimento endotelial

Estudos recentes abordando os PARs no sistema nervoso central demonstraram que esta família de receptores está relacionada a várias funções, com uma atuação crítica no equilíbrio entre a neuroproteção e neurodegeneração durante processos inflamatórios, danos teciduais e doenças cerebrais (SUO *et al.*, 2004).

Atualmente, os receptores PARs têm sido relacionados a várias disfunções cerebrais severas como Alzheimer, Parkinson e isquemia cerebral (YOSHIMURA *et*

al., 2006). A TABELA 2 resume algumas das conseqüências da ativação dos receptores PARs em células do tecido nervoso.

TABELA 2. Relação de acontecimentos intracelulares decorrentes da ativação de receptores ativados por proteases (PAR-1, PAR-2, PAR-3 E PAR-4)

<i>Tipo celular</i>	<i>Conseqüências da ativação dos PARs</i>
Neurônios	Apoptose, citoproteção, retração celular, potenciação dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato)
Astrócitos	Apoptose, proliferação celular, citoproteção, liberação de endotelina-1, aumento na liberação de NO (óxido nítrico) por citocinas, expressão da i-NOS (óxido nítrico sintase induzida), redução de mRNA
Microglia	Produção de NO, potenciação da produção do fator- α e liberação de outras citocinas, proliferação celular

Possível envolvimento dos PARs nas doenças neurodegenerativas :

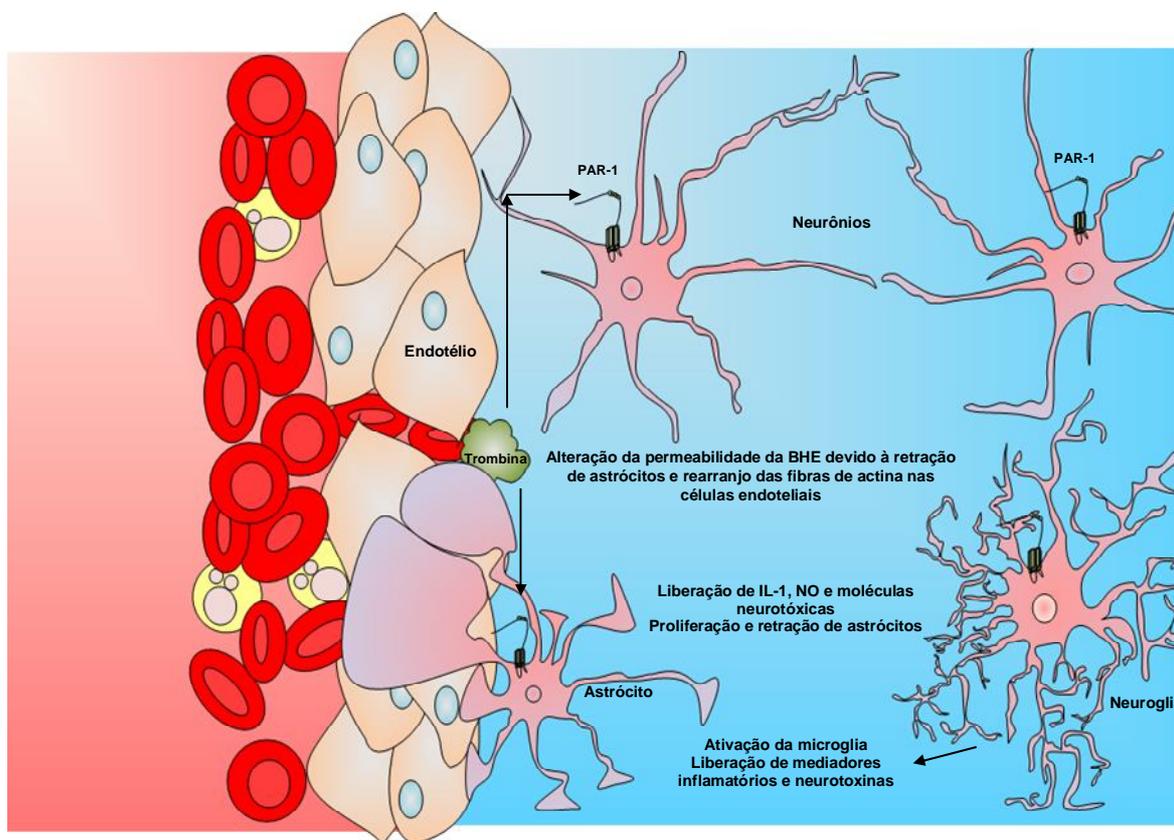
- ✓ Apoptose neural no Alzheimer
- ✓ Aumento na expressão do PAR-1 nos astrócitos na encefalite em pacientes HIV positivo
- ✓ Papel na inflamação neurogênica
- ✓ Diminuição de infarto após isquemia cerebral

Fonte ALVES-DA-SILVA *et al.*, 2006.

A trombina foi a primeira serinoprotease relacionada à ativação dos PARs, sendo descrita sua atuação nos receptores PAR-1, -3 e -4.

Existem vários aspectos importantes envolvendo a trombina e sua atividade sobre estes receptores. E esses aspectos vão muito além de sua conhecida atuação na coagulação sanguínea (COUGHLIN^b, 2005).

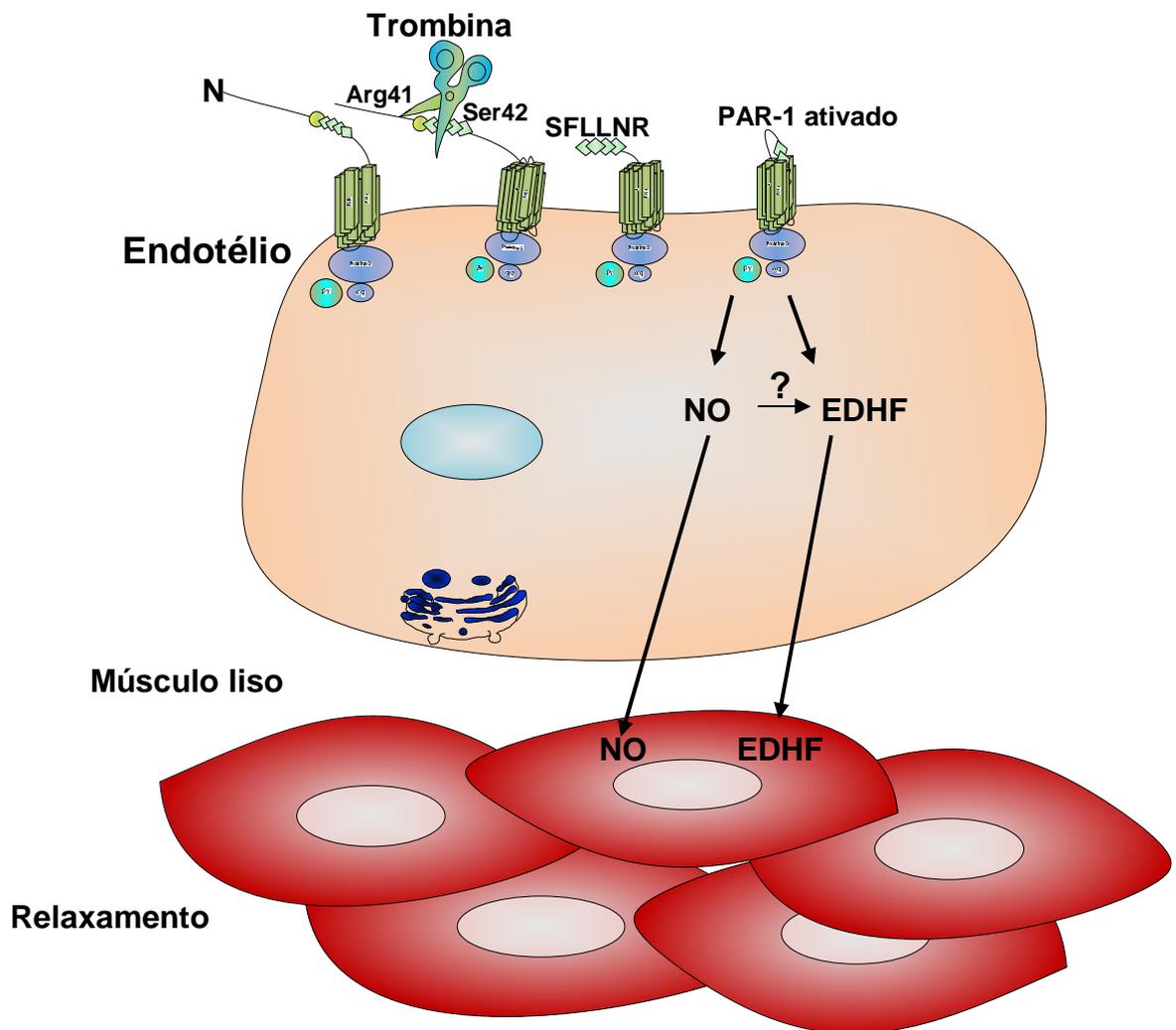
Estudos indicam que a ativação dos receptores PARs é o mecanismo pelo qual a trombina exerce suas múltiplas funções, atuando na fisiologia de vários sistemas como o nervoso (FIGURA 6) e o vascular (FIGURA 7). No sistema nervoso ela atua como uma potente molécula sinalizadora que regula respostas fisiológicas e patológicas em várias populações celulares e tecidos (TURGEON & HOUENOU, 1997).



Desenho elaborado pelo autor, baseado em NOORBAKHSH *et al.*, 2003; VERGNOLLE *et al.*, 2003.

FIGURA 6. Ativação dos receptores ativados por proteases no sistema nervoso central induzido por trombina.

NO – óxido nítrico; *EDHF* – fator hiperpolarizante derivado do endotélio



Desenho elaborado pelo autor.

FIGURA 7. Representação esquemática da ativação do PAR-1 pela trombina e a atuação no relaxamento do músculo liso vascular através da liberação de NO e/ou EDHF.

NO – óxido nítrico; EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

No sistema vascular a trombina pode atuar na pressão arterial influenciando, dependendo do local de sua produção, a vasodilatação ou vasoconstrição e a angiogênese (PATTERSON *et al.*, 2001; HIRANO, 2007).

A clivagem específica destes receptores e, conseqüentemente a sua ativação, permite o controle do crescimento e das 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).

Estudos com camundongos *knockout*-PAR-1^{-/-} (que não possuem o gene que expressa o receptor PAR-1) demonstraram que 50% dessa população não sobrevive muito tempo após o nascimento (DÉRY *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2005). Além disso, a larga distribuição tecidual desses receptores sugere sua importância fisiológica (KAWABATA & KURODA, 2000).

Apesar de todos os aspectos já definidos para os receptores PARs, nem todas as suas características foram totalmente esclarecidas. Alguns autores não descartam a hipótese de que outras serinoproteases possam ativar um ou mais deles (SEKIGUCHI *et al.*, 2007).

Já foi relatado (NGUYEN *et al.*, 1997) que os PARs, quando ativados pela trombina, promovem processos neurodegenerativos e também estão relacionados ao aumento da permeabilidade de células endoteliais em cultura, podendo agir na barreira hematoencefálica liberando a passagem de diferentes moléculas para o meio intersticial.

O aumento na permeabilidade vascular, ativação de plaquetas e vasodilatação induzida pela trombina ao atuar nos PARs forneceram fundamentos para mais comparações e hipóteses sobre a atividade da gioxina nestes receptores e podem estar relacionados à sua atividade neurotóxica.

Estudando a biodistribuição da gioxina (aspectos da DME - biodistribuição, metabolismo e excreção-TABELA 3) em camundongos, ALVES DA SILVA *et al.*, 2006 observaram uma correlação positiva entre a presença da gioxina e os receptores ativados por proteases em diversos tecidos (TABELA 4).

TABELA 3. Distribuição tecidual da [125I]giroxina e de receptores ativados por proteases (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4) em diversos órgãos

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

No grupo 1 estão os órgãos altamente irrigados e mais associados à concentração plasmática da proteína marcada. No grupo 2 estão os órgãos em que a eliminação foi mais rápida e no grupo 3 os de eliminação mais lenta (Fonte ALVES DA SILVA *et al.*, 2006).

TABELA 4. Distribuição tecidual dos receptores ativados por proteases (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4)

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

FONTE - ALVES DA SILVA *et al.*, 2006

A interação de serinoproteases de venenos de serpentes com receptores PAR de plaquetas foi descrita por SANTOS *et al.*, 2000, que demonstraram a ativação dos receptores PAR-1 e PAR-4 pelas toxinas PA-Bj do veneno de *Bothrops jararaca* e trombocitina do *Bothrops atrox*. Estes receptores são os intermediários para a agregação plaquetária e a degranulação induzidas por estas toxinas.

Nos experimentos *in vivo* para induzir a rotação em barril, a giroxina em geral, é injetada via intravenosa. Já foi demonstrado que este comportamento também pode ser observado após administração intraperitoneal, porém com dose um pouco maior (BARRABIN *et al.*, 1978). A via intravenosa é de rápida absorção e o endotélio é o primeiro tecido de contato da giroxina com o organismo.

Neste sentido, há ainda dois indicativos importantes relativos à atividade da giroxina no sistema vascular e que podem estar associados com a ativação de receptores PAR:

- o primeiro considera que a sua ação enzimática de serinoprotease trombina símile (CASTRO *et al.*, 2001) seja compartilhada em relação a ativação destes receptores ;
- o segundo tem por base a hipotensão e o aumento da concentração de óxido nítrico em células endoteliais, que são características da ativação do PAR-1, PAR-3 e PAR-4 pela trombina. O que sugere que estes sejam os alvos nos quais a giroxina atua para causar a hipotensão em ratos e a ativação da enzima eNOS em células endoteliais em cultura.

3.2 Serinoproteases do veneno de serpentes

As proteases são classificadas em Clãs e Famílias. Um Clã contém as enzimas com uma única origem evolutiva, evidenciada pelas semelhanças nas estruturas terciárias. Uma família é um conjunto de enzimas homólogas, ou seja, agrupadas pela semelhança na sequência de aminoácidos. Algumas famílias estão divididas em subfamílias (para mais detalhes veja um banco de dados para peptidases no sítio <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>).

A subfamília S1A, família da quimiotripsina, é a maior de todas as famílias de proteases, a qual pertencem a tripsina, a trombina, as calicreínas e diversas

serinoproteases isoladas de venenos de serpentes (SVSPs), tais como ancrod, batroxobin e giroxina, entre outras.

Atualmente são conhecidas mais de 150 sequências de SVSPs sendo que a maioria foi obtida por seqüenciamentos de cDNA. Apesar da grande similaridade estrutural, estas toxinas variam muito em relação às suas funções, decorrentes de diferenças sutis nos aminoácidos, porém sem afetar a conformação global (MARKLAND, 1998).

O dendrograma apresentado por YONAMINE *et al.*, 2009, alinha diversas serinoproteases e SVSPs cujas atividades hemotóxicas são bem descritas (FIGURA 3). Analisando-se os três grupos obtidos, pode-se observar que todas as toxinas atuam na cascata da coagulação e/ou agregação plaquetária, porém, algumas apresentam funções extras com características intermediárias entre um grupo e outro. As enzimas que clivam o fibrinogênio liberam fibrinopeptídeo A, B ou ambos (SERRANO & MAROUN, 2005). Entre as funções extras é de grande interesse a atividade hipotensora de algumas destas enzimas e muitos autores têm relatado ação direta nos vasos e não apenas em substratos endógenos circulantes (MARKLAND, 1998; HUNG & CHIOU, 2001; OYAMA & TAKASHI, 2003).

3.3 Serinoproteases, tônus vascular e permeabilidade da barreira hematoencefálica

A TM-VIG, trombina símile purificada do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (HUNG & CHIOU, 2001) e a crotalase purificada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND & DAMUS, 1971), promovem hipotensão em ratos, decorrente de sua atividade calicreína símile, a qual promove a liberação de bradicinina (MARKLAND, *et al.*, 1982; ESNOUV & TUNNAH, 1967; HATTON, 1973).

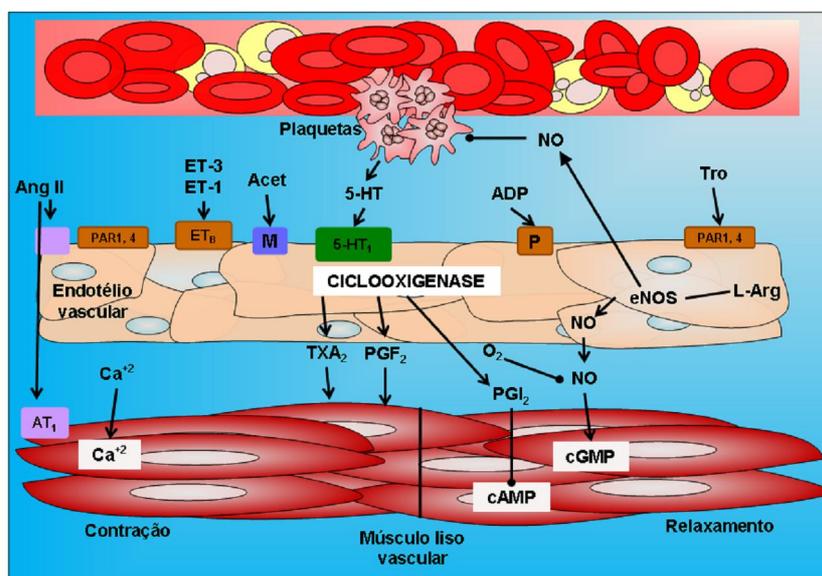
As enzimas helodermatine, gilatoxina e russellina também promovem hipotensão (UTAISINCHAROEN *et al.*, 1993; MARKLAND, 1998; HUNG & CHIOU, 2001; MUKHERJEE *et al.*, 2000; OYAMA & TAKAHASHI, 2003), porém ainda não se sabe ao certo qual a via que utilizam para promover esta atividade.

A pressão arterial é regulada por mecanismos que visam diminuir alterações agudas que possam ocorrer em torno de seu nível basal, mantendo

permanentemente este nível e sua estabilidade. No entanto, atualmente observa-se um crescente número de indivíduos com tendência a hipertensão arterial - nos países desenvolvidos 15% a 20% da população pode ser classificada como hipertensa (*"The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure"*, 1997). Assim, o desenvolvimento de novas drogas para tratamento destes casos é de grande importância clínica e econômica.

As toxinas de venenos animais tem sido uma fonte importante para o desenvolvimento de medicamentos inclusive para anti-hipertensivos como o Captopril® que está no mercado há décadas.

As células endoteliais atuam na regulação da pressão arterial por meio do metabolismo de algumas substâncias vasoativas como o óxido nítrico (NO) e prostaglandina I₂, que são fatores de relaxamento da musculatura lisa dos vasos e, através de fatores como endotelinas e angiotensina II, que estão relacionados com a contração (FIGURA 8).



Desenho elaborado pelo autor, baseado em PATTERSON *et al.*, 2001; CHAMBERS, 2008.

FIGURA 8. Plaquetas, endotélio, músculo liso e diferentes reguladores do tônus vascular. Ang II - angiotensina II; Tro - trombina; PAR-1 e -4 - receptor ativado por protease 1 e receptor ativado por protease-4; ET-3 e -1 - endotelina-3 e endotelina-1; ET_B - receptor de endotelina B; Acet - acetilcolina; M - receptor de acetilcolina; 5-HT - 5-hidroxitriptamina (ou serotonina); 5-HT₁ - receptor de 5-hidroxitriptamina; ADP - difosfato de adenosina; P - receptor de ADP; NO - óxido nítrico; eNOS - enzima óxido nítrico sintase endotelial; TXA₂ - tromboxano A₂; PGF₂ - prostaglandina F₂; PGI₂ - prostaciclina I₂; cAMP - adenosina monofosfato cíclico; cGMP - guanosina monofosfato cíclico.

O endotélio é o tecido mais importante na regulação do tônus vascular, a qual se dá através da liberação de potentes vasodilatadores e vasoconstritores.

O controle do tônus vascular é feito não só pela liberação de NO e prostaciclina, mas também por outras vias causando hiperpolarização das células musculares lisas subjacentes. Nesta característica está a origem do termo "fator hiperpolarizante derivado do endotélio – EDHF". No entanto, esta sigla inclui substâncias diferentes, como os metabólitos derivados do ácido araquidônico nas vias das ciclo-oxigenases, lipoxigenases e do citocromo P450, que são o H₂O₂, o CO, o H₂S e diversos peptídeos. Esses fatores ativam diferentes famílias de canais de K⁺ e hiperpolarizam o músculo liso vascular, contribuindo para os mecanismos que conduzem ao seu relaxamento. Além disso, outro caminho associado com a hiperpolarização de ambas as células, endotelial e de músculo liso, também contribui para o relaxamento dependente do endotélio (respostas mediadas por EDHFs). Estas respostas envolvem um aumento do cálcio intracelular nas células endoteliais, seguida pela abertura dos canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de condutância intermediária (IK) e de baixa condutância (SK).

Estes canais apresentam uma distribuição subcelular distinta, sendo que os canais SK são amplamente distribuídos ao longo da membrana plasmática, enquanto os IK são preferencialmente expressos nas projeções para as células endoteliais do músculo liso.

Na sequência da ativação do canal SK, a hiperpolarização do músculo liso se dá, preferencialmente, através do acoplamento elétrico com as células endoteliais através de junções gap mioendoteliais. Na sequência da ativação do canal IK, o fluxo de K⁺ se acumula no espaço mioendotelial e estimula a Na⁺K⁺ATPase e os canais Kir2.1 (canais de potássio retificadores) no músculo liso.

As respostas mediadas por EDHF são alteradas pelo envelhecimento e por diversas patologias e intervenções terapêuticas podem restaurar estas respostas (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006).

Os capilares sanguíneos são constituídos apenas por uma camada de células endoteliais, as quais se apóiam sobre uma lâmina basal e prendem-se umas às outras lateralmente, por meio de zônulas de oclusão. Os vasos sanguíneos, a partir de certo calibre, são constituídos de três camadas concêntricas distintas de tecido,

denominadas túnicas. A camada mais interna, denominada túnica íntima, é constituída por uma única camada de células endoteliais que formam um tubo, revestindo a superfície interna do vaso e o tecido conjuntivo subendotelial adjacente. A túnica média, camada intermediária, é formada por fibras musculares lisas, dispostas circularmente, às quais se agregam quantidades variáveis de fibras elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III) e proteoglicanas. A camada mais externa, túnica adventícia, consiste principalmente de tecido conjuntivo com fibras colágenas (colágeno tipo I) e elásticas (BOUGHARIOS *et al.*, 2004).

As células endoteliais presentes na túnica íntima dos vasos possuem várias especializações da membrana plasmática que permitem forte adesão e comunicação entre as células e são denominadas junções ocludentes, aderentes e comunicantes. A expressão e organização destes complexos juncionais dependem do tipo de vaso e da permeabilidade requerida para perfundir os órgãos (BAZZONI & DEJANA, 2004).

Os capilares do sistema nervoso central são contínuos e diferem morfológica e funcionalmente dos demais capilares do organismo, principalmente no que se refere à permeabilidade. Além de possuir funções mais elaboradas para o controle de sua permeabilidade, como por exemplo, junções oclusivas de alta resistência bem desenvolvidas e maior expressão de junções ocludentes, esses capilares são revestidos por ramos terminais dilatados, provenientes dos astrócitos, chamados de pés vasculares da neuroglia seguidos da membrana basal e, finalmente, células endoteliais que ficam em contato direto com o sangue (BUNDGAARD, 1986; JANZER & RAFF, 1987; RISAU, 1991; STEWART e COOMBER, 1986; FÖRSTER *et al.*, 2006; FÖRSTER *et al.*, 2008).

No cérebro as junções ocludentes são bem desenvolvidas contribuindo para um controle rigoroso da permeabilidade entre o sangue e o sistema nervoso. A barreira hematoencefálica é relativamente impermeável a íons, vários aminoácidos, pequenos peptídeos e principalmente a proteínas, tendo como principal função regular o transporte de substâncias entre o sangue e o tecido nervoso de forma a manter o ambiente neural protegido de substâncias neurotóxicas e de variações bruscas na composição sanguínea (BONDAN e LALLO 1998). A BHE também atua excluindo células inflamatórias do sistema nervoso central (LEIBOWITZ e HUGHES,

1983; STERNBERG, 1989). A presença de astrócitos se faz necessária para a indução e manutenção da BHE (JANZER e RAFF, 1987; RISAU, 1991), a qual, nos vertebrados, se localiza entre as células endoteliais dos capilares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos de qualidade pró-análise.

A água utilizada em todos os experimentos foi de alta pureza, resistividade maior que $18,2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ em temperatura ambiente.

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, na forma liofilizada, foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP (UNESP, Botucatu) e pelo Setor de Herpetologia do Instituto Butantan.

4.2 Animais

Os animais utilizados foram obtidos do biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) onde foram criados e mantidos em estantes ventiladas com condições sanitárias controladas. Nos experimentos iniciais de microscopia intravital os animais foram fornecidos pelo biotério do Instituto Butantan. Em ambas as situações, os animais receberam água e comida *ad libitum* e ficaram em salas com controle de temperatura e ciclo de luz natural.

Todas as manipulações seguiram as regras de cuidados de animais de laboratório (SBCAL/COBEA; NIH publ. No 86-23, revisado em 1985) e foram aprovadas pelo Conselho de Ética Animal do IPEN- Projeto n^o. 27/CEPA-IPEN/SP.

4.3 Obtenção da giroxina

A giroxina foi obtida pelo fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se cromatografias de afinidade e de exclusão molecular. Metodologia padronizada por ALVES-DA-SILVA (2004).

Aproximadamente 300 mg de veneno foram dissolvidos em 4 mL de solução tampão Tris HCl 50 mmolL⁻¹ pH 9,0; centrifugados a 10.000 g durante 1 minuto, a 4°C em coletor de fração GradFrac 100 (Pharmacia).

O sobrenadante foi fracionado em Benzamidina Sepharose 6B (GE Life Sciences) a 4°C, com fluxo de 0,2 mL/min.

A resina de afinidade possui o ligante p-Aminobenzamidine (PAB), um inibidor sintético das serinoproteases. A coluna (1,6x15 cm de comprimento), foi empacotada no próprio laboratório e ativada com ciclos alternados com tampão Tris HCl 100 mmolL⁻¹ pH 9,0 contendo NaCl 400 mmolL⁻¹ e tampão acetato de amônio 100 mmolL⁻¹ pH 4,5. O perfil cromatográfico foi obtido pela absorvância em 280 nm e foram coletadas frações de 1,0 mL. A eluição foi feita com tampão acetato de amônio 50 mmolL⁻¹ pH 4,5.

Os tubos contendo as serinoproteases (inclusive a giroxina) foram reunidos e liofilizados.

Para a segunda etapa do processo de obtenção da giroxina, o liofilizado foi dissolvido em 1 mL de tampão formiato de amônio 100 mmolL⁻¹ pH 3,0 e aplicado a uma coluna de Superdex 75 (XK 1,6 x 70) equilibrada no mesmo tampão. A eluição foi a 4°C, em fluxo constante de 0,5 mL/min. O registro do perfil cromatográfico foi obtido com a absorvância a 280 nm e foram coletadas frações de 1,0 mL.

As frações correspondentes à giroxina foram reunidas, feita a determinação do conteúdo protéico e, em seguida, liofilizadas em alíquotas de 5 a 100 µg.

4.4 Concentração protéica

A concentração protéica das amostras foi determinada com o método de Bradford modificado (BOLLAG *et al.*, 1996). Este se baseia na capacidade do

corante Coomassie Brilliant Blue G-250 se ligar às proteínas, em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional da cor, detectável em 595 nm.

Para a curva padrão fez-se uma diluição seriada de ovoalbumina 1 mg/mL em solução salina: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. Em seguida, foram separados 50 µL de cada diluição, em duplicata, e adicionados 1,0 mL do reagente.

A leitura da absorvância foi feita entre 5 a 60 minutos, em 595 nm, à temperatura ambiente.

Para as amostras foram analisados 50 µL em duplicata.

Os dados da curva padrão foram ajustados por regressão linear com a equação $Y = aX + b$ sendo (Y) a densidade óptica, (X) a concentração protéica (em mg/mL), (a) o coeficiente angular da reta e (b) o intercepto da reta em Y (quando a concentração é zero). Para tanto, utilizou-se o programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0). Esta versão também permite calcular a concentração protéica das amostras.

4.5 Teste da atividade *in vivo*

A atividade da gioxina isolada foi observada com o teste de neurotoxicidade, ou seja, a capacidade de induzir o rolamento em barril.

Para este ensaio, foram utilizados 5 camundongos machos Swiss pesando entre 25-35 gramas nos quais foram injetados 150 µL via intravenosa de gioxina (0,25 µg/g de peso corpóreo) dissolvida em salina. Após a injeção, cada animal foi mantido sob observação por até 60 minutos. O rolamento em barril foi observado e filmado.

4.6 Análise em 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 das frações separadas nas cromatografias, estimar a pureza da gioxina isolada e a

sua massa molecular tendo como referência o marcador de massa molecular comercial.

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

Foram analisadas cerca de 5 μL do marcador de massa molecular (segundo recomendações do fabricante), 40 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ para o veneno total e 10 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ para as amostras em tampão desnaturante (Tris HCl 80 mmolL^{-1} pH 6,8 contendo 2% SDS, 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). Todas as amostras foram aquecidas a 95°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 25 mmolL^{-1} , glicina 20 mmolL^{-1} pH 8,3

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

$$\text{Log}_{10} MM = A + B \cdot \mathbf{Rm}$$

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

A migração de cada proteína do padrão foi medida e relacionada com a do traçador, calculando-se a migração relativa (**Rm**).

A massa molecular (**MM**) da gioxina foi estimada pela relação inversamente proporcional das massas moleculares (em log) e da migração relativa (**Rm**) de cada proteína (WEBER & OSBORN, 1969).

4.7 Análise por dicroísmo circular

A giroxina purificada foi analisada por dicroísmo circular no laboratório de Biofísica da UNIFESP. O equipamento utilizado foi um espectropolarímetro marca Jasco, modelo J-180.

Para este ensaio 200 μL de uma solução contendo giroxina (1 mg/mL em tampão fosfato 25 mmolL^{-1} pH 7,6) foram colocados em uma cubeta circular de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm e analisada com uma variação de comprimento de onda de 195-260 nm.

A análise do registro da absorção diferenciada da luz polarizada permite identificar e quantificar a presença de estruturas organizadas na molécula (α hélice e folhas β) e em que porcentagem estão presentes. Para tanto, foi utilizado o programa K2d2 disponibilizado em:

<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d.html>

Os valores obtidos foram comparados aos teóricos calculados para as “prováveis” sequências da giroxina. As sequências analisadas estão na FIGURA 2 e foram obtidas em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

- *gyroxin-like* B2.1. (UniProtKB: locus VSPB2_CRODU, acesso Q58G94)
- *gyroxin-like* B1_3 *serine protease precursor* (*Crotalus durissus terrificus* - acesso EU360951.1)
 - *gyroxin-like* B1_4 *serine protease precursor* (*Crotalus durissus terrificus* - acesso EU360952.1).
 - *gyroxin-like* B1_7 *serine protease precursor* (*Crotalus durissus terrificus* - acesso EU360954.1).

Para a predição das estruturas organizadas em α hélice e folha β presentes nas sequências protéicas giroxina símile foi utilizado o algoritmo Jnet desenvolvido por CUFF & BARTON , 2000; e disponibilizado em:

(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/faq.html>)

4.8. Análise por microscopia intravital

Os ensaios por microscopia intravital foram iniciados no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan. Em uma segunda etapa, tiveram continuidade no Centro de Biotecnologia do IPEN.

4.8.1 Adequações do equipamento

Para a realização deste ensaio no CB-IPEN foi necessário a montagem de um sistema adequado para a realização do experimento (FIGURA 9).

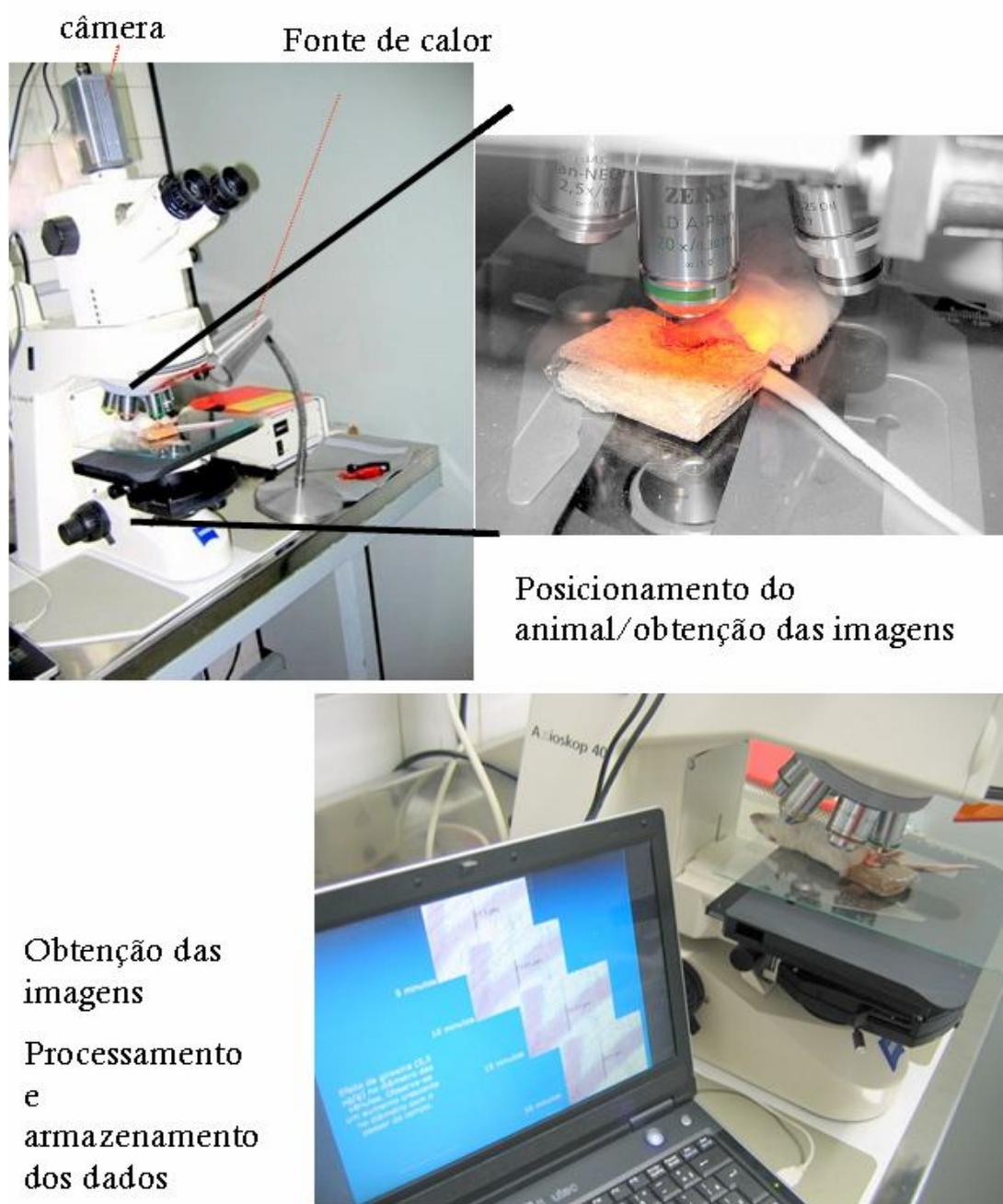


FIGURA 9. Equipamentos utilizados nos ensaios de microscopia intravital realizados no Centro de Biotecnologia (CB-IPEN).

Microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss®); Câmera CCD VI-6633 (Biocam® Co LTDA, 480 linhas); Lâmpada para aquecimento (Philips® Mini Spot 60W); Termômetro analógico (Geratherm® - Classic); placa de vidro; Objetiva 20x (LD A-PLAN 20x/0,30); Placa de captura de vídeo; Computador Itautec® W7210.

As imagens foram obtidas através de um Microscópio Axioskop 40 (marca Carl Zeiss®); com objetiva LD A-PLAN 20x/0,30 e tendo acoplado uma câmera CCD VI-6633 (Biocam® Co LTDA, 480 linhas).

As imagens foram capturadas e enviadas a um Computador Itautec® W7210 no qual foi instalado uma placa de captura de vídeo e o programa AxionVision Release 4.4 (04-2005) da Carl Zeiss.

Para validar as adequações, os ensaios controles foram repetidos e comparados com os obtidos anteriormente (total de 4 repetições para cada controle), observando-se os seguintes parâmetros: vasodilatação, vasoconstrição, rolamento e adesão de leucócitos.

4.8.2 Procedimento experimental

Os ensaios foram iniciados sempre no período da manhã, em um laboratório de experimentação com temperatura controlada.

Para os ensaios por microscopia intravital foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 23 a 28 gramas.

Os animais foram mantidos aquecidos durante todo o experimento (temperatura corpórea dos animais a 37°C) mantendo próximo a ele uma fonte de calor incandescente (lâmpada Philips® Mini Spot 60W). Para o monitoramento da temperatura foi usado termômetro analógico (Geratherm® - Classic)

Os animais foram anestesiados com uma injeção subcutânea no dorso - 100µL para cada 10 g de peso corpóreo (100 µL de Cloridrato de Quetamina+200 µL de Xilasina diluída em 700 µL de salina). Em seguida, cada animal anestesiado foi submetido aos procedimentos cirúrgicos necessários para exposição do músculo cremáster (FIGURA 10). Estes animais foram posicionados sobre uma placa de vidro transparente (20x11x0,3 cm), utilizada para possibilitar a visualização do músculo cremáster após cirurgia. Nesta placa o animal anestesiado foi posicionado em decúbito dorsal e fixado pelas patas com fita adesiva. Uma vez exposto, o músculo cremáster foi então esticado por cinco pontos distintos, com auxílio de alfinetes, formando uma área transparente através da qual foi possível visualizar as estruturas microvasculares.



FIGURA 10. Cirurgia e preparação do músculo cremáster para o ensaio por microscopia intravital.

As fotos ilustram, em sequência, as principais etapas da cirurgia:

- 1. Nos animais anestesiados foi feita uma incisão e exposição do músculo cremáster.*
- 2. Uma vez exposto, o músculo cremáster foi então esticado por cinco pontos distintos, com auxílio de alfinetes, formando uma área transparente através da qual foi possível visualizar as estruturas microvasculares.*
- 3. Os animais foram posicionados sobre uma placa de vidro transparente, utilizada para possibilitar a visualização das vênulas pós-capilares no microscópio.*

Uma vênula, facilmente observável ao microscópio na superfície transparente, foi então escolhida aleatoriamente para análise. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução tampão de Ringer-Locke a 37°C (BAEZ et al., 1973).

Dez minutos após a exposição, o diâmetro da vênula pós-capilar (20 a 40 µm) foi medido e tomado como referência para as comparações subseqüentes; ou seja, após a aplicação tópica das soluções a serem analisadas.

Em todos os grupos as medidas dos diâmetros vasculares foram feitas a cada 5 minutos e até 20 minutos de observação. Os resultados foram expressos como variação do diâmetro, em µm (ou seja, a diferença entre o diâmetro da vênula no momento da medida e o diâmetro no tempo zero).

Inicialmente foram utilizados dois grupos com cinco animais cada, a saber:

- Grupo 1 - grupo controle no qual foram aplicados topicamente (na porção exposta da vênula pós-capilar), 5 µL de salina estéril.
- Grupo 2 - grupo no qual foram aplicados topicamente 5 µL de giroxina (0,5 µg).

Confirmada a atividade da giroxina no tônus vascular, foram iniciados os ensaios com os inibidores específicos. Novamente foram repetidos os grupos controles (salina e giroxina) do protocolo anterior.

Os novos grupos foram:

- Grupo 3 – tratado com SCH 79797 (N³-ciclopropil-7-((4-(1-metilfenil)fenil)metil)-7H-pyrrolo(3, 2-f)quinazolina-1,3-diamina dihidroclorido, fornecido pela Tocris Bioscience, Ellisville, MD). Esta droga é um inibidor competitivo do receptor ativado por protease 1 (PAR-1), e foi utilizada na dose 25 µg/kg dissolvida em salina injetado via intravenosa, 60 minutos antes da salina (AHN *et al.*, 2005).
- Grupo 4 – tratado com SCH 79797. Foi utilizada uma dose de 25 µg/kg dissolvida em salina injetada via intravenosa, 60 minutos antes da aplicação tópica de giroxina no músculo cremáster.

- Grupo 5 – tratado com L-NAME (L-N^G-nitro arginina metil ester obtido da Sigma Chemical, Co., St. Louis). Esta droga é um inibidor inespecífico da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Foram utilizados 100 mg/kg dissolvidos em salina estéril e administrado por via subcutânea 60 minutos antes da aplicação tópica de salina.
- Grupo 6 – tratado com L-NAME (L-N^G-nitro arginina metil ester obtido da Sigma Chemical, Co., St. Louis). Foram utilizados 100 mg/kg dissolvidos em salina estéril e administrado por via subcutânea 60 minutos antes da aplicação tópica de giroxina.
- Grupo 7 – tratado com Ouabaína. Este é um glicosídeo cardíaco produzido no córtex da glândula supra-renal; é um inibidor da Na⁺K⁺ATPase. Foram injetados, via intravenosa, 100 µL de uma solução a 10⁻⁷ molL⁻¹ dissolvidos em salina 60 minutos antes da salina.
- Grupo 8 – tratado com Ouabaína. Foram injetados, via intravenosa, 100 µL de uma solução a 10⁻⁷ molL⁻¹ dissolvidos em salina 60 minutos antes da giroxina.

4.8.3 Análise Estatística

Os resultados da microscopia intravital nos diferentes tempos de observação foram expressos como média ± desvio padrão das diferenças entre os diâmetros das vênulas pós-capilares (em micrometro) antes e após a aplicação da giroxina.

Na estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, que compara todos os grupos entre si. Foram consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$. Para tanto, foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 5.0).

4.8.4 Rolamento e adesão de leucócitos

Esta observação foi feita em todos os animais utilizados no ensaio de microscopia intravital. Para tanto, foram selecionadas, em cada animal, de uma a três vênulas pós-capilares, medindo de 20 a 40 µm, sendo contados os leucócitos

em rolamento, ou seja, que transitaram em um percurso de 100 μm , em um período de 1 minuto após 10 minutos da exposição da vênula.

Nesta mesma região foram contados os leucócitos aderidos, isto é, os que ficaram no mínimo 30 segundos estacionados em um ponto próximo à parede do vaso.

Finalmente, foram contados os leucócitos migrados (os que atravessaram a parede vascular passando para o tecido).

4.8.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Na estatística foi novamente utilizada a análise de variância (ANOVA) comparando os grupos em cada intervalo de tempo: aos 5, 10, 15 e 20 minutos. Quando se obteve uma diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) foi aplicado teste de comparação múltipla de Bonferroni com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 5.0).

4.9 Agregação plaquetária em microplacas

Este ensaio foi desenvolvido baseando-se em BEDNAR *et al.* (1995).

4.9.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas

Inicialmente foram coletados 20 mL de sangue venoso humano de doadores voluntários saudáveis e que não tomaram algum medicamento há pelo menos 10 dias, em um tubo plástico contendo 1,6 mL da solução citrato-dextrose (85 mmolL^{-1} de citrato de sódio, 65 mmolL^{-1} de ácido cítrico e 110 mmolL^{-1} de dextrose). O sangue foi centrifugado a 200 g por 20 minutos, (centrifuga 5820R Eppendorf) em temperatura ambiente e foi separado o plasma rico em plaquetas (PRP).

O PRP foi transferido para outro tubo plástico no qual foi adicionado prostaglandina E_1 até a concentração final de 1 μmolL^{-1} . A suspensão celular foi novamente centrifugada, em temperatura ambiente, a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de plaquetas foi ressuspensão em tampão

Tyrode sem Ca^{2+} (134 mmolL^{-1} NaCl, 3 mmolL^{-1} KCl, $0,3 \text{ mmolL}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 2 mmolL^{-1} MgCl_2 ; 5 mmolL^{-1} HEPES, 5 mmolL^{-1} glucose, 12 mmolL^{-1} NaHCO_3 , 1 mmolL^{-1} EGTA e $3,5 \text{ mg/mL}$ de soro albumina bovina, pH 6,5. Essa suspensão foi centrifugada em temperatura ambiente a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de plaquetas ressuspendido no mesmo tampão *Tyrode*, sem adição de EGTA, pH 7,4.

Em seguida, foi feita a contagem em câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de 2×10^6 células/mL.

Para os ensaios, todas as soluções, as microplacas e a suspensão de plaquetas foram colocadas a 35°C em banho-maria. Durante o ensaio, a temperatura foi mantida constante em 35°C dentro do próprio leitor (Microplates Reader, Molecular Devices Spectra Max 190), a concentração de plaquetas foi a mesma (200000 células em $100 \mu\text{L}$ /poço), a velocidade e o intervalo das agitações também foram constantes.

Como controle negativo, foram incubadas plaquetas nas mesmas condições das amostras, apenas na presença do tampão *Tyrode*, em todos os ensaios. O branco foi o tampão *Tyrode* utilizado para diluir todos os reagentes.

4.9.2 Agregação plaquetária - giroxina

No primeiro ensaio foi feita a comparação da indução da agregação plaquetária entre os agonistas, trombina e giroxina. Para tanto, foram adicionados trombina $1 \mu\text{molL}^{-1}$ ou giroxina $1 \mu\text{molL}^{-1}$ (concentração final), em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionadas plaquetas lavadas, feita a primeira agitação de 15 segundos e a primeira leitura da porcentagem de transmitância a 405 nm (%T). A temperatura foi mantida em 35°C , sendo feitas agitações e medida da transmitância a cada minuto, até 20 minutos de ensaio.

4.9.3 Agregação plaquetária – inibidores

Os ensaios seguintes foram para avaliar a participação dos receptores PAR-1 e PAR-4 na atividade da gioxina em plaquetas. Para tanto, foram utilizados os inibidores SCH 79797 e tcY-NH₂.

O composto SCH 79797 foi adicionado nas concentrações de 1, 3 e 10 µmolL⁻¹, 30 minutos antes da adição do agonista (trombina 1 µmolL⁻¹ ou gioxina 1 µmolL⁻¹).

O mesmo protocolo foi seguido para o ensaio com o inibidor de PAR 4. O composto tcY-NH₂ foi adicionado na concentração de 400 µmolL⁻¹ sozinho e junto com SCH 1, 3 ou 10 µmolL⁻¹.

A concentração de trombina, de gioxina e o número de plaquetas/poço foram as mesmas utilizadas nos ensaios anteriores; assim como as condições de reação (agitação, temperatura, etc) e leitura da %T.

Os resultados das leituras da %T foram fornecidos pelo programa SoftMax Pro versão 5.2, que também permitiu visualizar a evolução da reação em tempo real.

Para a comparação entre os grupos, as %T foram transformadas em porcentagem de agregação utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{Agregação} = [(T - T_0) / (T_{100} - T_0)] \times 100$$

Onde:

T = Transmitância da amostra

T₀ = Transmitância das plaquetas sem agonista

T₁₀₀ = Transmitância do tampão

4.9.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados como variáveis XY, sendo Y a porcentagem de agregação e X os diferentes intervalos de tempo. Todas as curvas foram ajustadas pelo modelo não linear, hipérboles de um ou dois sítios.

A constante cinética e a concentração efetiva 50% (EC50) foram os parâmetros utilizados para comparar a giroxina e a trombina. A agregação máxima foi o parâmetro de comparação das atividades na presença dos inibidores.

Estes parâmetros foram comparados estatisticamente com ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Benferroni. Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). Foram consideradas significantes diferenças com $p < 0,01$.

4.10 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

Para avaliar a atuação da giroxina na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) o método desenvolvido foi baseado no descrito por KAYA *et al.*, 2004.

Neste método é quantificado o corante azul de Evans presente em homogeneizados cerebrais após determinado tratamento. Este corante tende a se complexar com a albumina sérica formando complexos maiores que 60 kDa, portanto, que só estariam presentes no cérebro após atravessar a BHE.

O complexo azul de Evans-albumina pode se formar na circulação do animal ou ser preparado no laboratório. Optou-se pela segunda possibilidade.

O conjugado de albumina bovina-azul de Evans foi preparado apenas com a mistura das duas soluções. A solução de Azul de Evans a 2% foi preparada com a dissolução do corante em salina, da mesma forma que a solução de albumina bovina sérica 10 mg/mL. Foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) e filtradas em 0,45 μ m (Millex). Esse complexo deve ser injetado em até 10 minutos antes da injeção do manitol (controle positivo) ou da giroxina (grupo amostra) - tempo para que ocorra a alteração da permeabilidade da BHE; após esse tempo a permeabilidade gradualmente volta ao normal.

Como KAYA *et al.* (2004) utilizaram ratos, foi necessário verificar a aplicabilidade do método em camundongos, assim como comprovar que os anestésicos utilizados não interferem no ensaio.

4.10.1 Padronização do ensaio

Os animais foram anestesiados com uma injeção subcutânea no dorso – 100 µL para cada 10 g de peso corpóreo (100 µL de Cloridrato de Quetamina+200 µL de Xilasina diluída em 700 µL de salina 150 mmolL⁻¹).

Inicialmente foram analisados 4 grupos com 5 animais cada.

- Grupo 1. Sem tratamento. O primeiro grupo não recebeu nenhum tratamento prévio;
- Grupo 2. Salina. O segundo grupo recebeu 100 µL de salina, via intravenosa,
- Grupo 3. Controle negativo. O terceiro grupo recebeu 100 µL da solução do conjugado albumina bovina-azul de Evans e em seguida, 100 µL de salina,
- Grupo 4. Controle positivo. Este grupo de animais recebeu 100 µL do conjugado seguido de 100 µL da suspensão de manitol.

Após 10 minutos, os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para abertura da caixa torácica, exposição do coração e fixação de uma cânula. Esta foi acoplada a uma bomba peristáltica para perfusão do animal com cerca de 250 mL de salina, com o fluxo de 10 mL/min.

Os cérebros dos animais perfundidos foram retirados, pesados, umedecidos com 2,5 mL de tampão fosfato salina pH 7,2 e macerados. Após a maceração foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético 50%, seguida de agitação por 2 minutos em *vortex*. Após a homogeneização os extratos foram refrigerados a 10°C e centrifugados a 1000 *g* por 30 minutos. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (610 nm).

Para determinar a concentração de azul de Evans nos extratos cerebrais foi utilizada uma curva padrão com diluições seriadas da solução estoque do corante (fator 1:2, no intervalo de concentração de 0,12 a 31,25 µg/mL) e lida a absorvância em 610 nm. Os dados foram analisados por regressão linear $Y=aX+b$ sendo Y a

absorvância medida e X a concentração do corante. O resultado foi expresso como μg de azul de Evans/mg de tecido cerebral.

4.10.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica - giroxina

Para o ensaio de avaliação da atividade da giroxina na permeabilidade da BHE foram utilizados 30 camundongos *Swiss*, machos (pesando entre 23-30 gramas) divididos em grupos com 5 animais cada.

- Grupo 1. Controle negativo. Recebeu duas aplicações de salina (60 μL de NaCl 150 mmolL^{-1} cada) via intravenosa, com intervalo de 5 minutos.
- Grupo 2. Controle positivo. Recebeu o conjugado albumina bovina-azul de Evans na dose de 2 $\mu\text{L/g}$ de peso corpóreo. Após 5 minutos, recebeu a solução de manitol (0,5 mg/g de peso corpóreo), via intravenosa.
- Grupos 3-4-5. Giroxina. Estes grupos receberam o conjugado albumina bovina-azul de Evans na dose de 2 $\mu\text{L/g}$ de peso corpóreo e após 5 minutos, giroxina 0,25 $\mu\text{g/g}$, ambos via intravenosa. Os animais tratados com giroxina foram sacrificados após 7 minutos (grupo 3), 15 minutos (grupo 4) ou 30 minutos (grupo 5).

4.10.3 Análise estatística

Como no ensaio de padronização, os animais foram perfundidos. Depois de retirados os cérebros, foram preparados os homogeneizados. A quantificação do corante em cada amostra foi obtida por comparação com a curva padrão.

Para a comparação entre os grupos utilizou-se a análise de variância, seguido pelo teste Dunnett. Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism software (versão 5.0). Foram consideradas significantes, diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção da giroxina

Na estratégia desenvolvida para purificação da giroxina foi utilizado inicialmente a resina de afinidade Benzamidina Sepharose 6B (FIGURA 11A) e em seguida a exclusão molecular em Superdex 75 (FIGURA 11B).

A cromatografia de afinidade separou duas frações, nomeadas AP1 e AP2.

A fração AP1 é constituída pelas toxinas que não se ligaram com a Benzamidina, portanto, são outros constituintes do veneno que não pertencem às enzimas serinoproteases.

A fração AP2 é constituída por serinoproteases e só eluíram após a mudança de pH de 9,0 para 4,5; sendo em seguida, congelada. Após liofilização, foi dissolvida em tampão formiato de amônio 100 mM pH 3,0.

Os perfis cromatográficos da exclusão molecular (FIGURA 11 B) comparam o veneno total e a fração da giroxina. Ambos foram obtidos nas mesmas condições de fluxo, temperatura, volume e concentração da amostra.

O perfil de fracionamento do veneno total foi a referência para determinar o volume de eluição (V_e) da giroxina (identificada com uma barra em vermelho).

5.2 Concentração protéica

A determinação da concentração protéica nas diferentes etapas do processo de purificação nos forneceu um rendimento de 2,3% (7 mg de giroxina obtida a partir de 300 mg de veneno processado).

5.3 Teste de atividade *in vivo*

A atividade biológica foi comprovada no ensaio *in vivo* específico, em que foi observada a indução do rolamento em barril (atividade neurotóxica da giroxina).

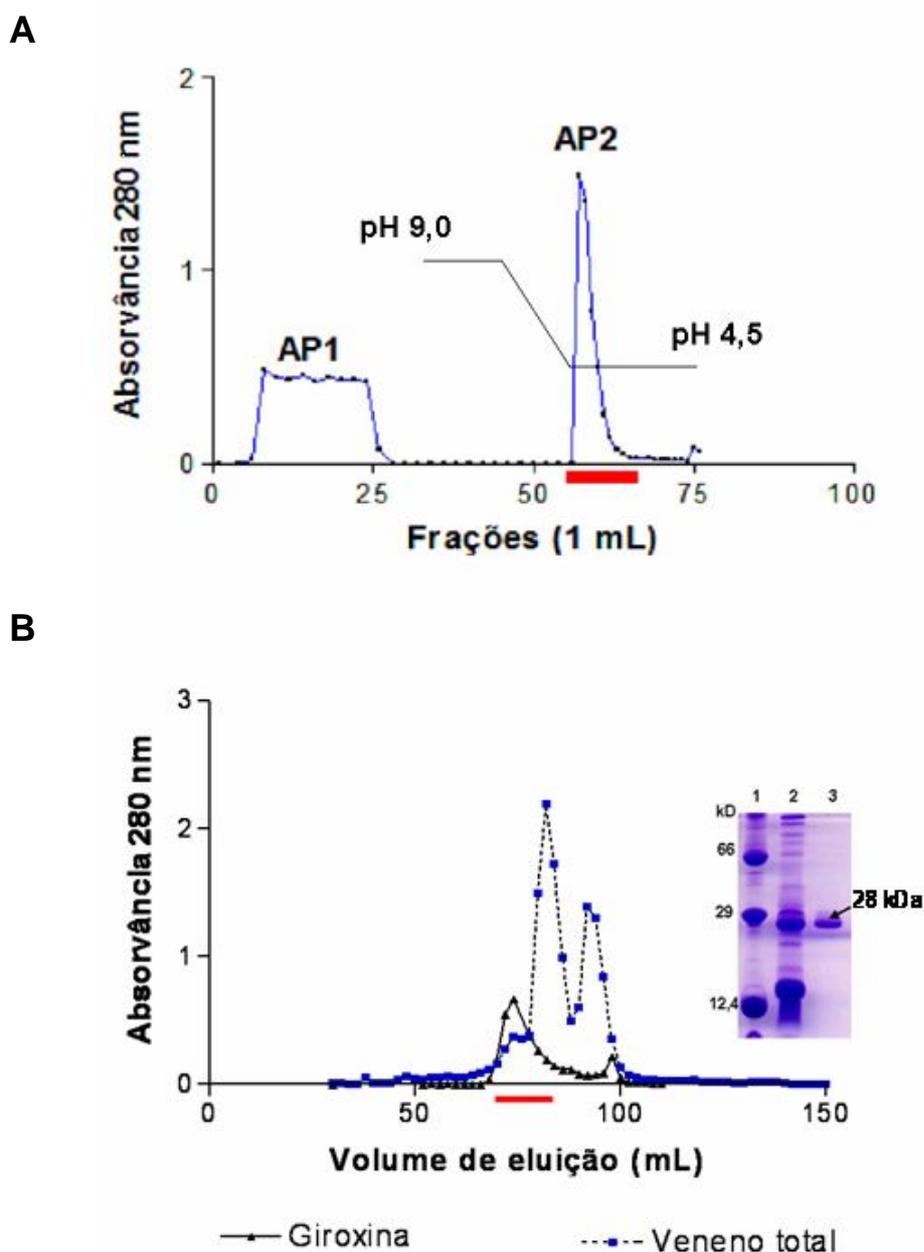


FIGURA 11. Estratégia de purificação da giroxina.

- A. Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em afinidade com Benzamidina Sepharose 6B. O eluente inicial foi tampão Tris HCl 100mmolL^{-1} pH 9,0 e o eluente final; acetato de amônio 50mmolL^{-1} pH 4,5, fluxo $0,2\text{ mL/min}$, volume de fração $1,0\text{ mL}$, temperatura 4°C .
- B. Perfil de eluição da cromatografia em Superdex75. O tampão eluente foi formiato de amônio 100mmolL^{-1} pH 3,0; fluxo $0,5\text{ mL/min}$; frações de 1 mL , temperatura 4°C . As linhas tracejadas na cor azul são referentes ao veneno total.

A detecção foi pela absorvância em 280 nm . A região da eluição da giroxina está destacada pelo traço vermelho. Na foto do gel (a direita do cromatograma de exclusão molecular: 1 marcador de massa molecular; 2 veneno total de *Crotalus durissus terrificus*; 3 fração obtida na exclusão molecular; a seta indica a banda referente à giroxina, no final da purificação, com massa molecular calculada de 28 kDa).

5.4 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise em eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sistema desnaturante não reduzido pode ser vista como um adendo da FIGURA 11B. A giroxina migrou no gel como uma banda única e com massa molecular calculada em 28 kDa, comprovando a eficiência do método de purificação e a integridade da molécula.

5.5 Análise por dicroísmo circular

O espectro obtido está na FIGURA 12 e confirma a presença de estruturas organizadas na giroxina purificada, tendo sido calculado em 4% a presença de α hélice e 48% de folhas β (programa K2d2).

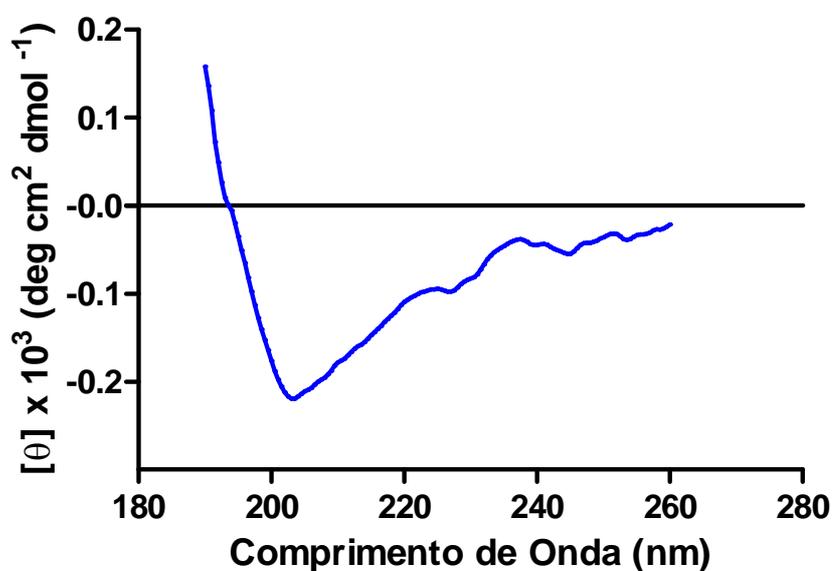


FIGURA 12. *Elipticidade Molar da giroxina (1 mg/mL) medida entre 190 e 260 nm em tampão fosfato 25 mmolL⁻¹, pH 7,6.*

A análise do perfil obtido (registro da absorção diferenciada da luz polarizada) permite estimar que 4% da estrutura está organizada em α hélice; 48% em folhas β e os demais aminoácidos estão em estruturas ao acaso (randon coil). O programa utilizado foi K2d2 disponibilizado em <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d.html>

Estes valores de α hélice e folhas β são compatíveis com os obtidos teoricamente para as sequências de giroxina símile B1-2; B1-3; B1-4 e B1-7 calculadas com o algoritmo Jnet (TABELA 5).

TABELA 5. Porcentagem das cadeias alfa, beta e randômica na estrutura secundária da giroxina obtida experimentalmente e calculadas para as seqüências análogas.

<i>PROTEÍNA</i>	<i>AMINOÁCIDOS</i>	<i>α-HÉLICE (%)</i>	<i>FOLHA β (%)</i>	<i>REFERÊNCIAS</i>
Giroxina	ND	4	48	
TSV-PA	234	3,4	30,3	Q91516
B2-1	238	3,4	18,1	Q58G94
B1-3	238	3,8	29,4	BOFXM1
	238	3,8	28,2	BOFXM2
B1-4	235	6,8	25,5	BOFXM3
B1-7				

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)

ND: não determinado.

5.6 Análise por microscopia intravital

Na FIGURA 13 é apresentada uma seqüência de fotos de uma vênula pós-capilar do músculo cremáster de um camundongo *Swiss* após aplicação tópica de giroxina (0,5 μ g). Nesta seqüência de fotos pode-se observar o aumento do diâmetro da vênula com o passar do tempo (5 a 20 minutos).

Na FIGURA 14 são apresentados os mesmos resultados da figura anterior após os cálculos de variações dos diâmetros das vênulas para os grupos 1 e 2 descritos no item 4.8.2. No grupo controle foi aplicada salina e no segundo, 0,5 μ g de giroxina, ambas topicamente.

No grupo tratado com salina não foi observado aumento no diâmetro das vênulas. A análise estatística comprovou que já a partir dos 5 minutos a

vasodilatação medida no grupo tratado com giroxina estava significativamente maior que a do grupo controle ($p < 0,05$).

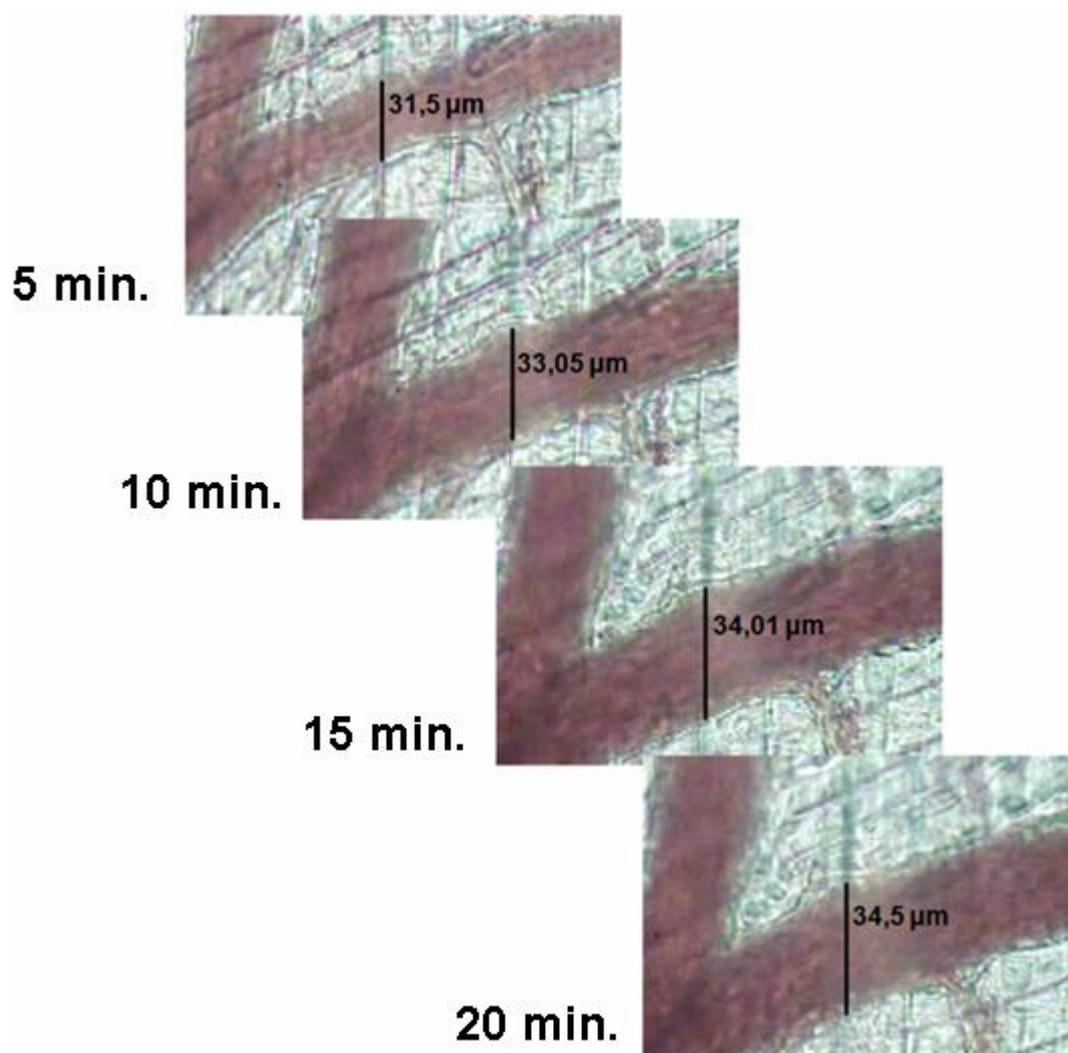


FIGURA 13. Representação esquemática da análise por microscopia intravital. Efeito da giroxina ($0,5 \mu\text{g}$) no diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremaster. Observa-se um aumento crescente no diâmetro com o passar do tempo. Medidas obtidas com objetiva 20X e utilizando o programa AxionVision Release 4.4 (04-2005) da Carl Zeiss.

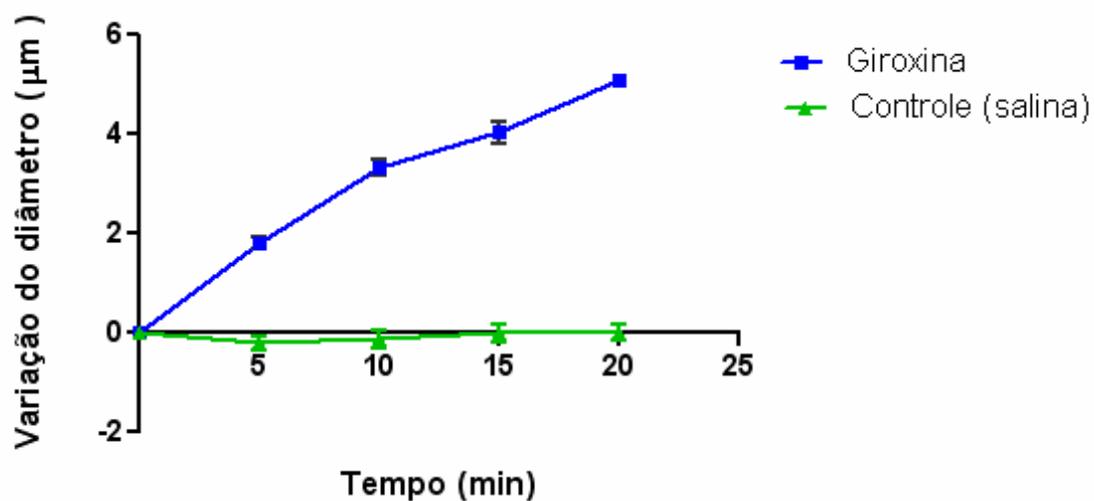


Figura 14. *Variação de diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongos Swiss normais (grupos 1 e 2 do item 4.8.2) após aplicação tópica de 0,5 µg de giroxina (controle positivo) ou salina (controle negativo). A diferença foi significativa em todos os intervalos de tempo ($p < 0,05$).*

A FIGURA 15 apresenta os dados dos grupos (grupos 3, 4 e 5 do item 4.8.2), em que os animais foram tratados com uma injeção intravenosa de SCH 79797 (inibidor do receptor PAR1) 60 minutos antes da aplicação tópica de 0,5 μg de giroxina. De forma semelhante ao grupo controle negativo (que só recebeu salina – grupo 1), o grupo 4 não apresentou aumento no diâmetro das vênulas.

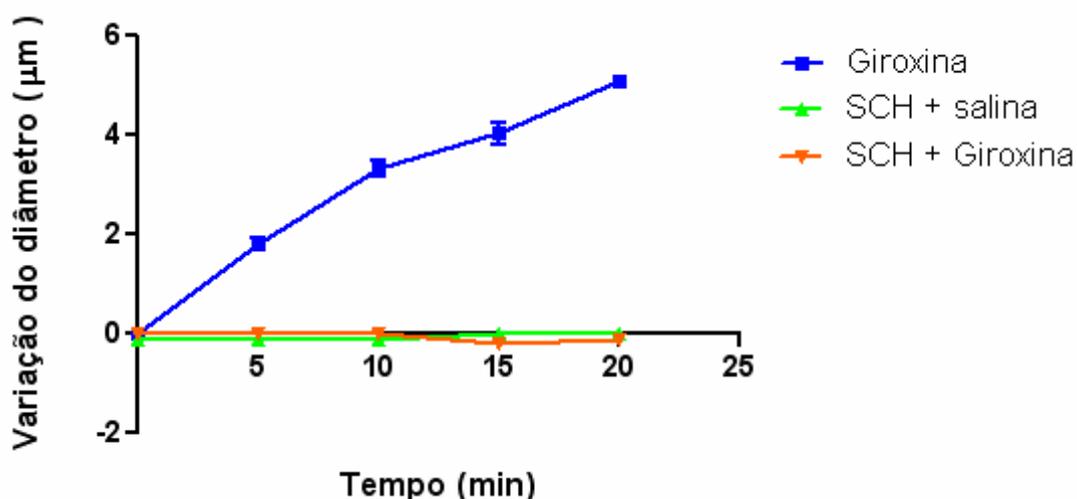


FIGURA 15. Variação de diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongos Swiss normais (grupos 2, 3 e 4 do item 4.8.2) após aplicação tópica de 0,5 μg de giroxina (controle positivo).

No grupo amostra, os camundongos foram tratados com o inibidor SCH 79797, na dose de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, via intravenosa, 60 minutos antes da giroxina, aplicação tópica.

No controle negativo os animais foram tratados com o inibidor nas mesmas condições e estimulados apenas com salina, aplicação tópica.

Nos animais tratados com o inibidor não ocorreu a vasodilatação induzida pela giroxina (controle positivo).

Estatisticamente, o grupo controle positivo (grupo 2) apresentou diferença significativa a partir de 5 minutos ($p < 0,05$) dos três grupos (grupos 1, 3 e 4).

Os resultados obtidos com os dois outros inibidores (grupos 5 e 6 tratado com L-NAME e grupos 7 e 8 com ouabaína) também foram estatisticamente diferentes do grupo 2.

Na FIGURA 16 o gráfico demonstra que os animais do grupo injetado com L-NAME (grupos 5 e 6) não apresentaram aumento no diâmetro das vênulas e na FIGURA 17 pode-se observar os resultados obtidos com ouabaína (grupos 7 e 8). Em ambos os casos verifica-se que não há diferença entre o controle negativo e o grupo tratado com os inibidores. A estatística comprova que ambos são significativamente diferentes do controle positivo já a partir de 5 minutos e que não diferem entre si.

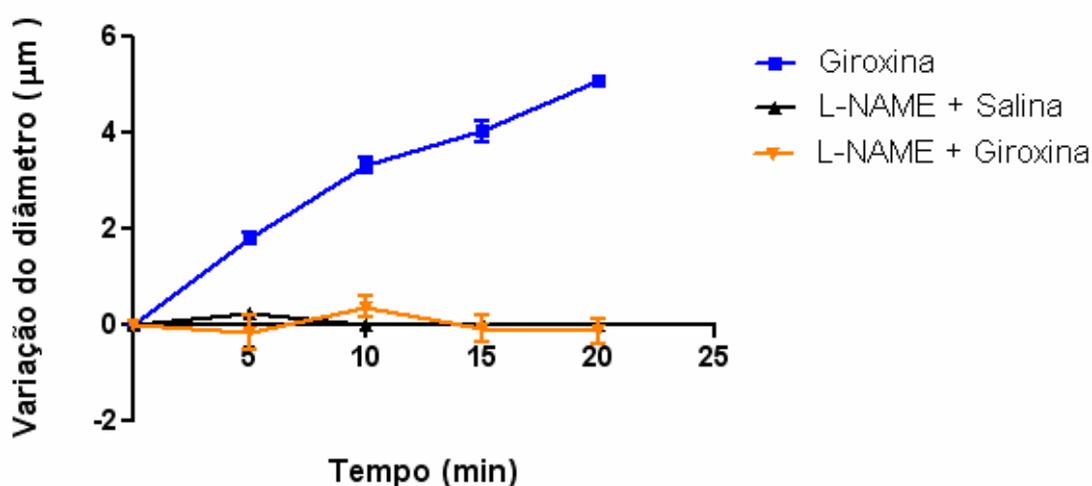


FIGURA 16. Variação de diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongos Swiss normais (grupos 2, 5 e 6 do item 4.8.2) após aplicação tópica de giroxina 0,5 µg (controle positivo).

No grupo amostra, os camundongos foram tratados com o inibidor L-NAME, na dose de 100 mg/kg, via subcutânea, 60 minutos antes da giroxina 0,5 µg, aplicação tópica. No controle negativo os animais foram tratados com o inibidor nas mesmas condições e estimulados apenas com salina, aplicação tópica.

Nos animais tratados com o inibidor não ocorreu a vasodilatação induzida pela giroxina (controle positivo).

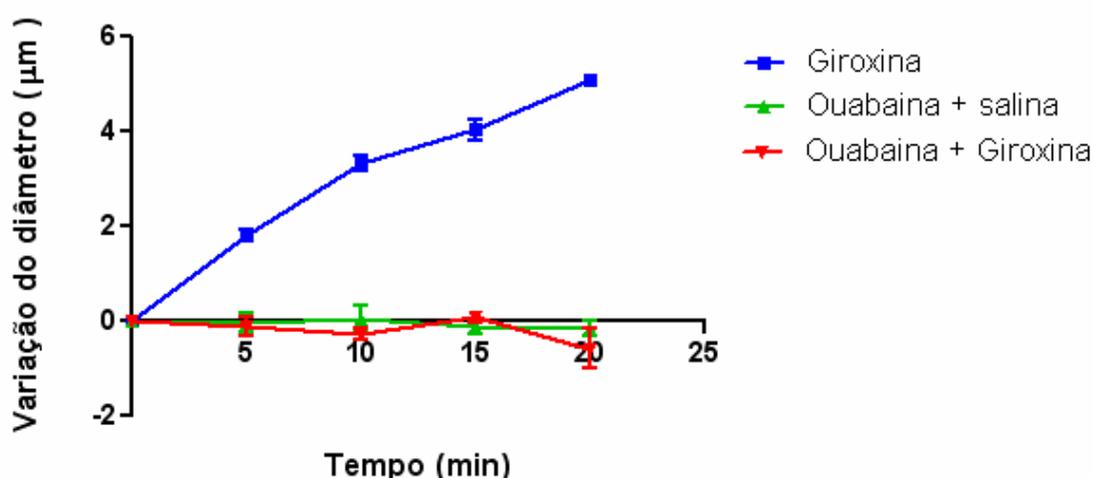


Figura 17. Variação de diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongos Swiss normais (grupos 2, 7 e 8 do item 4.8.2) após aplicação tópica de giroxina 0,5 µg (controle positivo).

No grupo amostra, os camundongos foram tratados com ouabaína, na dose de 100 µL de uma solução 10^{-7} M em salina, via intravenosa, 60 minutos antes da giroxina 0,5 µg, aplicação tópica.

No controle negativo os animais foram tratados com o inibidor nas mesmas condições e estimulados apenas com salina, aplicação tópica.

Nos animais tratados com o inibidor não ocorreu a vasodilatação induzida pela giroxina (controle positivo).

5.7 Rolamento e adesão de leucócitos

As FIGURAS 18 e 19 apresentam o percurso de 100 µm das vênulas escolhidas para observação de adesão e rolamento dos leucócitos.

Primeiramente verificou-se um número pequeno de leucócitos presentes no espaço intravascular, indicando que não ocorreu liberação de fatores pro-inflamatórios no local; reação importante para outras toxinas como as metaloproteases do veneno de *Bothrops jararaca* (CLISSA *et al.*, 2006).

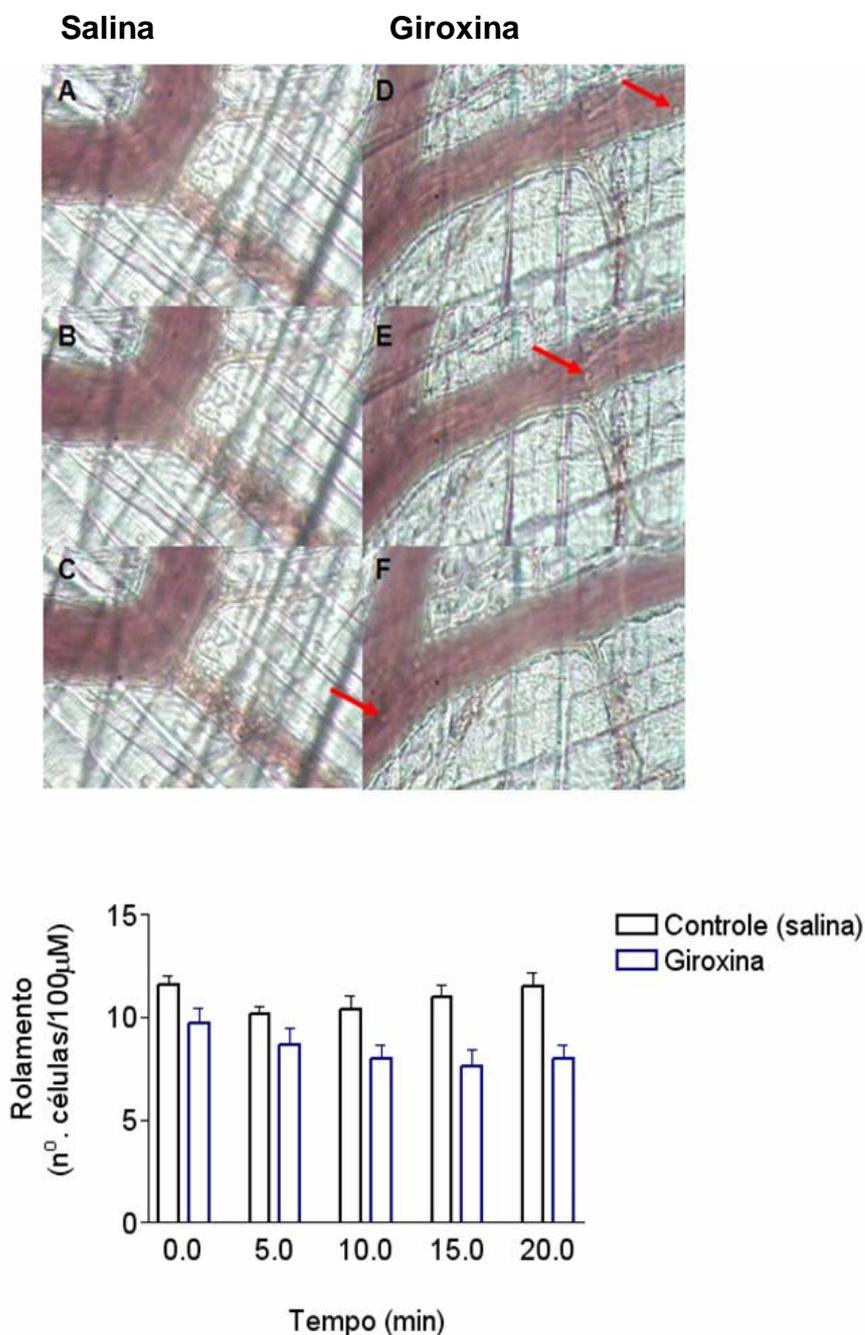


FIGURA 18. Observação e registro dos leucócitos em rolamento.

A sequência de fotos acima, identificadas como D, E e F, permite acompanhar o rolamento de um leucócito ao longo de uma vênula pós-capilar do músculo cremáster de camundongo Swiss normal. Este tecido recebeu a aplicação tópica de 0,5μg de gioxina e a imagem foi obtida após 10, 20 e 35 segundos. As setas em vermelho indicam o leucócito em rolamento. As fotos A, B e C são de um animal controle negativo.

O gráfico apresenta a contagem de leucócitos em rolamento, em um percurso de 100 μm de vênula.

As figuras mostram as comparações das contagens de leucócitos em rolamento (FIGURA 18) e aderidos (FIGURA 19) dos grupos controle (só tratados com salina) e grupos que receberam aplicação tópica de giroxina.

A análise estatística demonstrou que não há diferenças significativas entre os grupos controles e tratados com giroxina ($p < 0,05$) tanto no parâmetro adesão quanto no rolamento dos leucócitos.

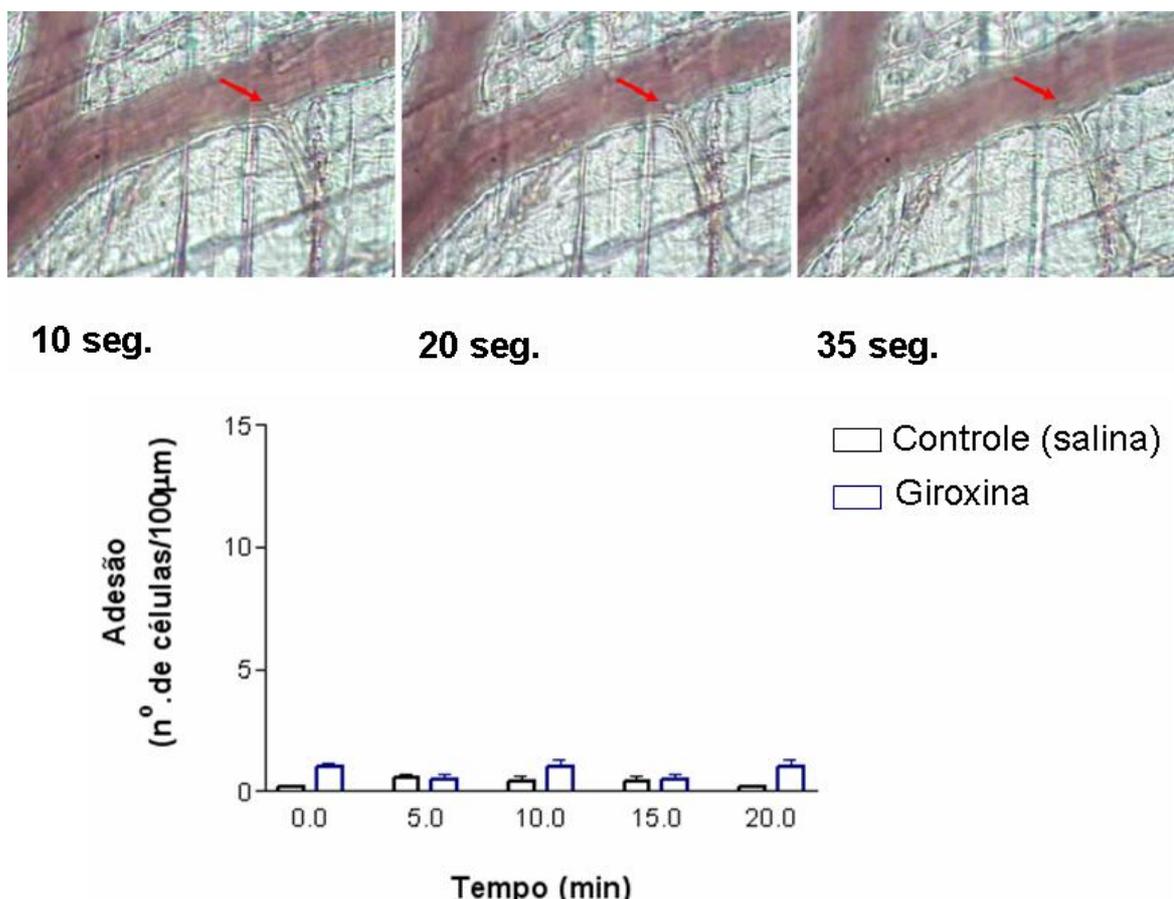


FIGURA 19. Observação e registro dos leucócitos aderidos.

A sequência de fotos acima permite a observação da região intravascular das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongo Swiss normal. Este tecido recebeu a aplicação tópica de $0,5 \mu\text{g}$ de giroxina e a imagem foi obtida após 10, 20 e 35 segundos. O gráfico apresenta a contagem de leucócitos aderidos em um percurso de $100 \mu\text{m}$ de vênula. As setas em vermelho indicam um leucócito aderido.

As imagens foram obtidas com o microscópio Axioskop 40, objetiva 20x (Carl Zeiss).

Aqui cabe comentar que apenas o grupo controle tratado com ouabaína apresentou um aumento significativo no número de leucócitos em rolamento ($p > 0,05$). Dados não mostrados.

5.8 Agregação plaquetária em microplacas

A FIGURA 20 apresenta a cinética da agregação plaquetária induzida por $1 \mu\text{molL}^{-1}$ de giroxina e $1 \mu\text{molL}^{-1}$ de trombina, utilizando-se plasma rico em plaquetas, confirmando a capacidade da giroxina em induzir a agregação plaquetária embora com cinética diferente da trombina. Ambas as curvas foram ajustadas por hipérbolos com um sítio ligante ($r^2 = 0,998$) e um máximo de ligação próximo a 45%; sendo que a constante de equilíbrio de dissociação para a giroxina foi de 5,17 e para a trombina de 0,92.

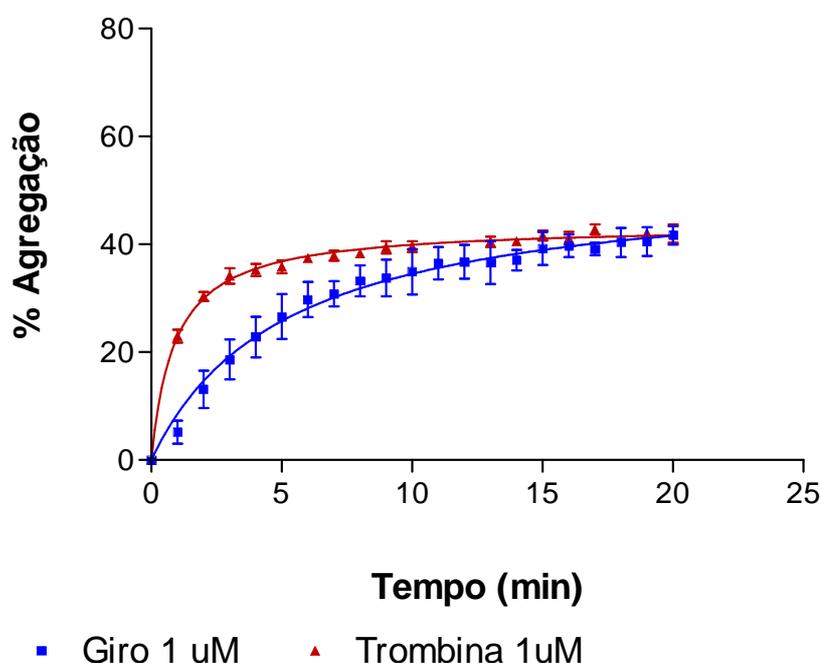


FIGURA 20. Cinética da agregação plaquetária induzida por $1 \mu\text{molL}^{-1}$ de giroxina e $1 \mu\text{molL}^{-1}$ de trombina, utilizando-se plasma rico em plaquetas.

A etapa seguinte foi inibir os receptores ativados por proteases (PAR-1 e PAR-4), sabidamente envolvidos no processo de agregação plaquetária induzido por

trombina. As curvas cinéticas na presença dos inibidores SCH 79797, o tcY-NH₂ apresentaram um melhor ajuste no modelo hiperbólico com dois sítios ligantes ($r^2 = 0,998$). A comparação dos valores calculados para a agregação máxima (FIGURAS 21 e 22) confirmou que ocorreu diminuição significativa neste parâmetro para a trombina e também para a gioxina ($p < 0,05$).

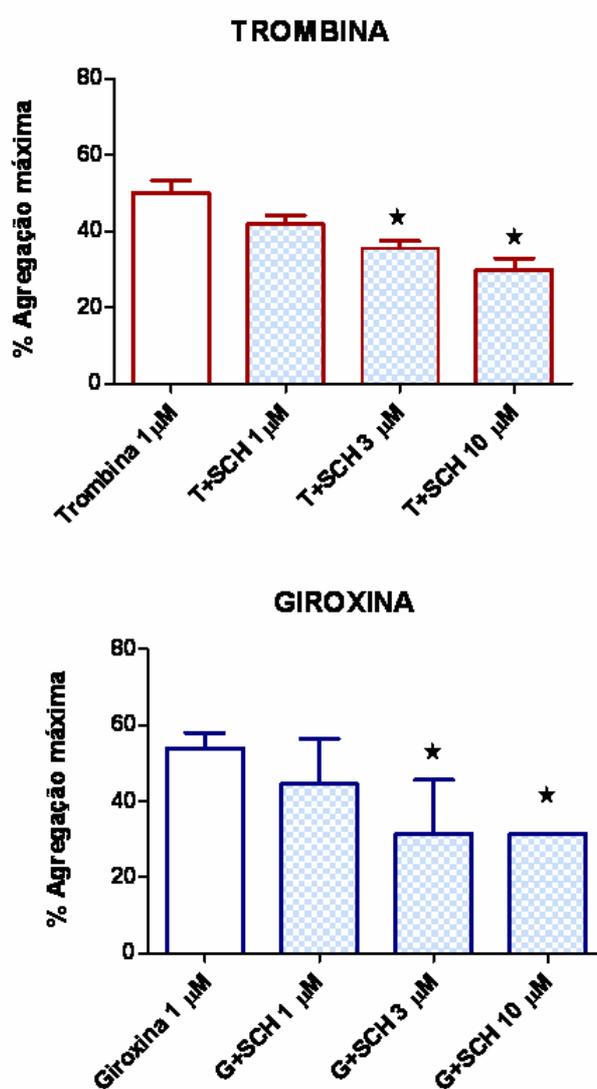


FIGURA 21. Ação do inibidor SCH 79797, nas doses 1, 3 e 10 μmolL^{-1} , na agregação plaquetária máxima (em %) induzida por Trombina 1 μmolL^{-1} e Giroxina 1 μmolL^{-1} .

Apenas as concentrações de 3 e 10 μmolL^{-1} do inibidor diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a agregação máxima das plaquetas para os dois agonistas.

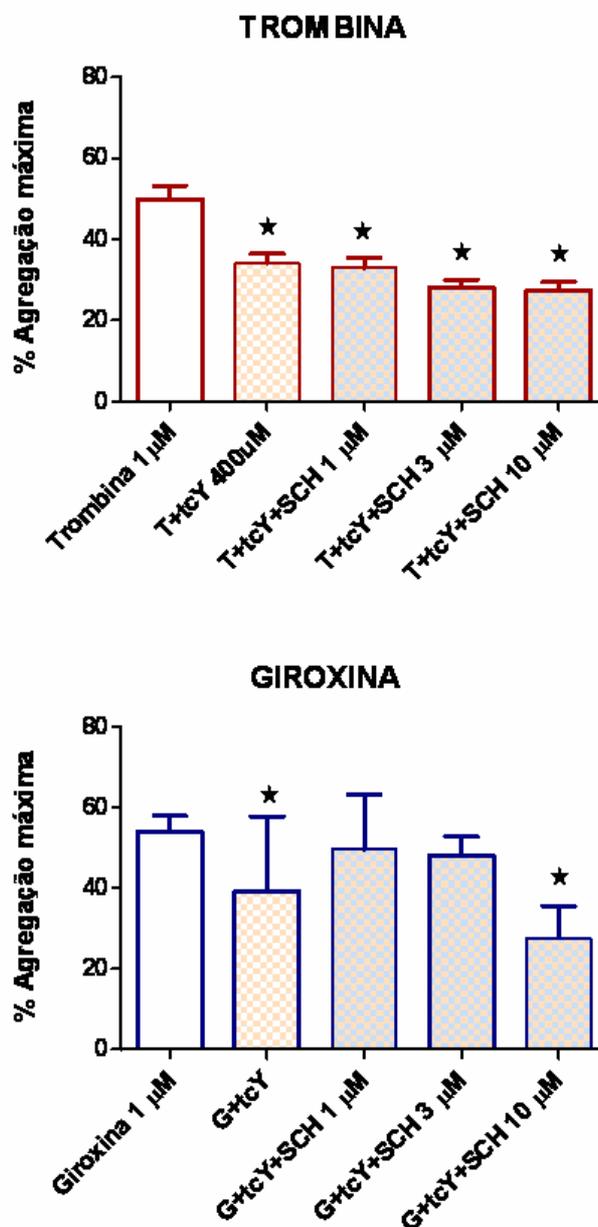


FIGURA 22. O inibidor $tcY-NH_2$ $400 \mu molL^{-1}$ inibiu significativamente ($p < 0,05$) a agregação plaquetária máxima (em %) induzida pelos dois agonistas (trombina $1 \mu molL^{-1}$ e giroxina $1 \mu molL^{-1}$).

Na associação com SCH 79797 nas doses 1, 3 e $10 \mu molL^{-1}$, a inibição foi significativa em todas as doses para a trombina. Já para a giroxina $1 \mu molL^{-1}$ apenas a associação com a concentração de $10 \mu molL^{-1}$ do inibidor diminuiu significativamente a agregação plaquetária máxima ($p < 0,05$).

5.9 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

Este ensaio teve uma primeira etapa de padronização com camundongos e utilização de anestésicos.

Na FIGURA 23 é apresentado o gráfico da curva padrão construída para determinar a concentração de Azul de Evans (AE).

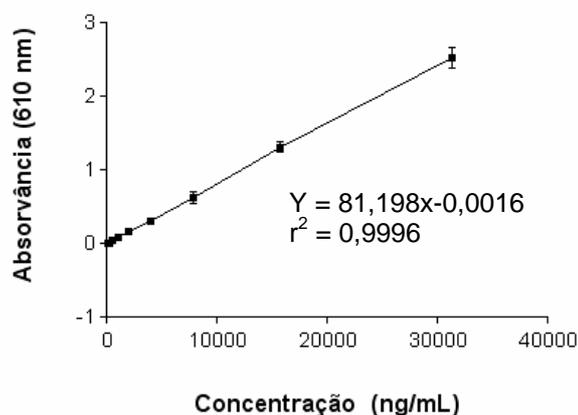


FIGURA 23. Curva padrão utilizada para estimar a concentração de Azul de Evans-Albumina presente nos extratos cerebrais.

Na FIGURA 24, pode-se observar que os extratos cerebrais do grupo tratado com manitol apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de azul de Evans, confirmando a alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Nos extratos cerebrais do grupo de animais em que não foram injetadas substâncias exógenas (grupo nomeado sem tratamento) não foi observada qualquer alteração, pois a densidade óptica manteve-se no zero.

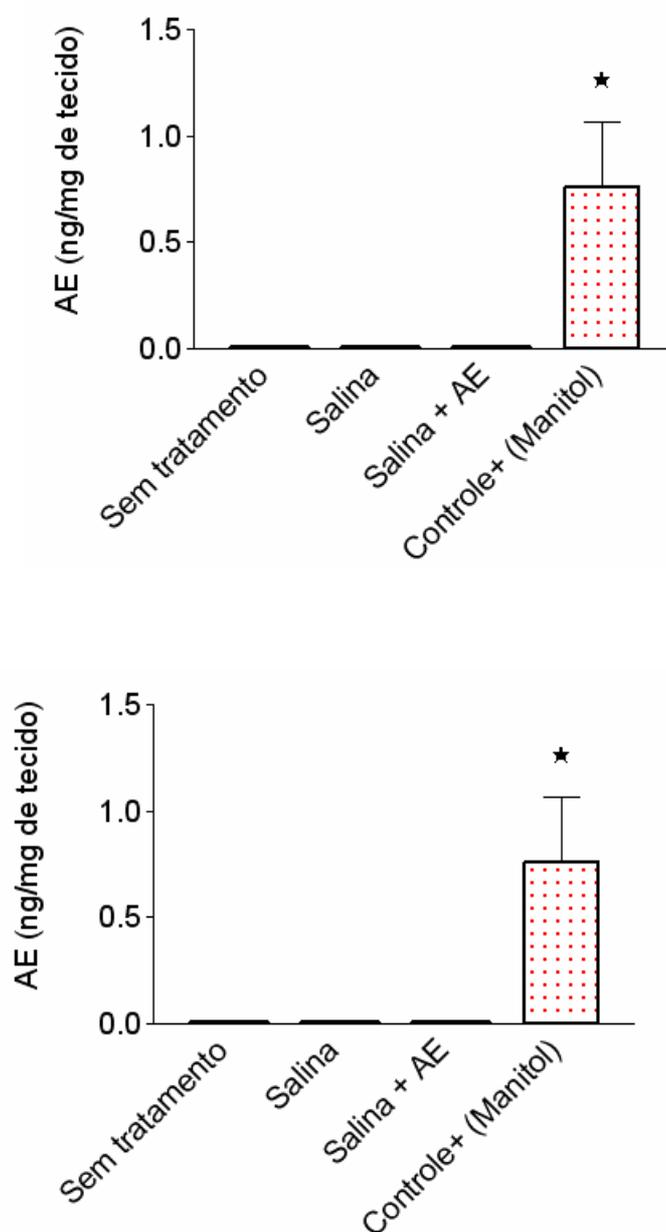


FIGURA 24. Dosagem de azul de Evans (AE) no sobrenadante do extrato cerebral de camundongos Swiss com e sem injeção endovenosa de salina (controle negativo) ou manitol 20% na dose de 0,5 g/kg (controle positivo).

O grupo tratado com manitol apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo.

O mesmo ocorreu com grupos tratados com salina ou controle negativo (salina e azul de Evans).

Nos extratos cerebrais dos grupos tratados com giroxina e sacrificados após 7 ou 15 minutos (FIGURA 25) foi possível observar resíduos do AE. Este fato confirma pela primeira vez a atuação da giroxina na permeabilidade da barreira. Esta alteração ocorreu nos minutos iniciais e de forma semelhante ao manitol, foi reversível, pois após 30 minutos a presença do AE não foi mais detectada.

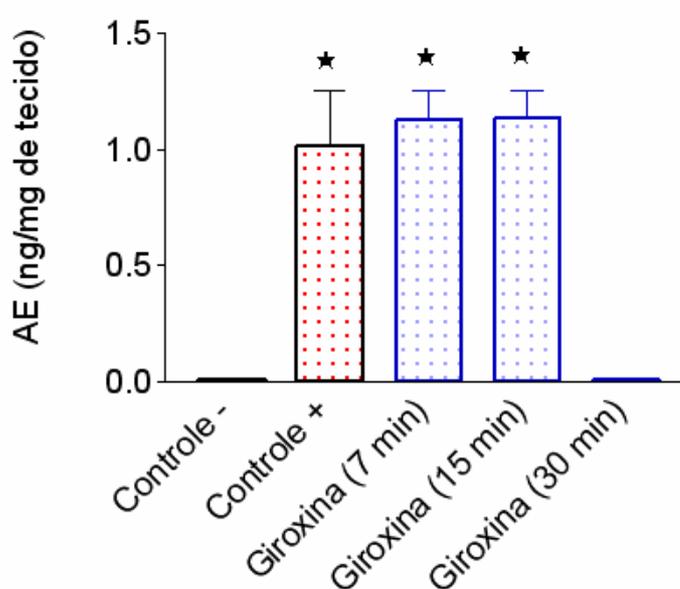


FIGURA 25. Dosagem de azul de Evans (AE) no sobrenadante do extrato cerebral de camundongos Swiss com e sem injeção endovenosa de salina (controle negativo) e manitol 20%, 0,5 g/kg. (controle positivo).

Os grupos tratados com giroxina 0,25 $\mu\text{g/g}$ e sacrificados após 7 ou 15 minutos apresentaram um aumento significativo na concentração de AE nos extratos cerebrais ($p < 0,05$).

O grupo sacrificado após 30 minutos, não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo.

6 DISCUSSÃO

O veneno crotálico é uma complexa mistura de proteínas e peptídeos biologicamente ativos, aminas biogênicas e outras substâncias que possuem atividades seletivas em muitos processos fisiológicos. As alterações fisiológicas induzidas pelos venenos de serpentes são comuns a muitas espécies e são responsáveis pela imobilização, captura e morte das presas. O tônus vascular é, muitas vezes, alterado de forma brusca e prolongada e este fato pode estar relacionado a uma atuação sinérgica entre as toxinas presentes nos venenos (BJANARSON *et al.*, 1983; HODGSON & ISBISTER, 2009).

O veneno total de *Crotalus sp* possui atividades que podem ser classificadas como neurotóxicas, miotóxicas, coagulantes e anticoagulantes (MARKLAND, 1998). Alguns de seus componentes estão bem caracterizados (OGUIURA *et al.*, 2005) e outros nem tanto (CAMPOS *et al.*, 2006).

Neste estudo o fracionamento do veneno nativo foi iniciado com a coluna de afinidade, específica para serinoproteases ao invés do método tradicional (BARRABIN *et al.*, 1978; ALEXANDER *et al.*, 1988) visto que a proteína de interesse pertence a este grupo, mais de 60% do total de proteínas corresponde à crotóxina (que não interage com esta resina) e a giroxina representa apenas 2,5% do veneno total (CAMILLO *et al.*, 2001).

Esta estratégia para isolamento da giroxina foi padronizada por ALVES-DA-SILVA (2004) e manteve o rendimento final evitando as freqüentes diferenças de potência entre as preparações, pois permitiu que uma quantidade maior de veneno fosse fracionada em cada lote de purificação.

Esta fase do trabalho foi concluída com os resultados esperados obtendo-se giroxina com grau de pureza e em quantidade suficientes para os ensaios subseqüentes, com as características estruturais e todas as suas atividades biológicas preservadas (rolamento em barril, agregação plaquetária e vasodilatação).

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que a giroxina induz queda na pressão arterial de ratos anestesiados (ALVES DA SILVA, 2004), no entanto, esta atividade nem sempre é observada em vítimas de acidentes com cascavéis, como

descrito por BUCARETCHI *et al.* (2002). Já nos acidentes com *Lachesis muta muta* a hipotensão é um sintoma importante nos pacientes e pode estar ligado às atividades da proteína análoga da giroxina (DA SILVA *et al.*, 1989).

A queda na pressão arterial de suas presas parece ter sido um evento crucial para a sobrevivência das espécies que possuem uma toxina com esta atividade. As possibilidades de ação na vasodilatação são muitas e cada uma dessas toxinas parece ter sua forma peculiar de ação no sistema vascular associada às particularidades nas estruturas moleculares (MARKLAND, 1998).

Alguns trabalhos relatam que a queda na pressão arterial induzida por venenos ofídicos pode estar relacionada não só com as trombina símiles presentes nos venenos, mas também com os vários componentes do veneno atuando conjuntamente (MARKLAND, 1998; FONSECA, 2005).

Procurando compreender a ação da giroxina nos vasos, HASHIZUME & CAMILLO (2005), analisaram a atividade da giroxina em células endoteliais ECV304 em cultura. Os autores detectaram um aumento significativo da atividade da eNOS (enzima óxido nítrico endotelial) nas células expostas à toxina, o que indicou que o óxido nítrico participa do mecanismo de ação.

No ensaio *in vivo*, feito no presente trabalho, a ação da giroxina foi mensurada através do registro da dilatação das vênulas pós-capilares do músculo cremáster de camundongos. O pré-tratamento do animal com L-NAME (inibidor específico da enzima eNOS) aboliu este efeito, confirmando a participação do óxido nítrico nesta atividade.

O ensaio por microscopia intravital também permitiu abordagens com outros inibidores específicos (SCH 79797 e ouabaína). A inibição ocorrida após tratamento do animal com o SCH 79797 sugere que a via de comunicação transmembrana utilizada pela giroxina para induzir a dilatação das vênulas foi mediada pela atuação no receptor PAR-1 e, os sinais subseqüentes levaram a produção de óxido nítrico (conforme já citado acima). Nesse ponto, torna-se necessário ressaltar a aparente ausência de atividade da giroxina no receptor PAR-4, uma vez que foi utilizado apenas o inibidor de PAR-1 e todo o efeito foi abolido.

O receptor PAR-4 é responsável por uma sinalização mais prolongada, embora alguns autores afirmem que existe certa redundância entre sua ativação e a

ativação do PAR-1. No entanto, utilizando camundongos PAR-1^{-/-} ou PAR-4^{-/-}, KATAOKA *et al.* (2003) comprovaram a participação de ambos os receptores nas atividades da trombina. O receptor PAR-4 é ativado em altas concentrações ou na ausência do PAR-1 e, ainda assim, de acordo com a célula, espécie ou tecido estudado (SHAPIRO *et al.*, 2000; SAMBRANO *et al.*, 2001).

A inibição total da vasodilatação após tratamento com o SCH 79797 obtida neste trabalho pode ter ocorrido porque a concentração de gioxina utilizada não atingiu a concentração mínima necessária para ativar o PAR-4 e a subsequente sinalização celular. Aqui cabe relatar que a dose utilizada foi a máxima possível, pois nas tentativas de aumentar a dose de gioxina ocorreu coagulação do sangue circulante nas vênulas, impossibilitando o prosseguimento do registro.

A inibição total da dilatação das vênulas induzida pela gioxina nos animais tratados com L-NAME sugere que o NO é um dos, se não o único, composto ativo na via metabólica utilizada pela gioxina após clivar o receptor PAR-1.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por KAWABATA *et al.* (2004) que conseguiram atenuar a vasodilatação de artérias mesentéricas superiores de ratos, induzida por agonistas dos receptores PARs. Os autores sugerem que o receptor PAR-1 estimula a liberação de NO e EDHF. Por outro lado, alguns pesquisadores duvidam da existência de outra molécula envolvida na hiperpolarização celular, induzida após ativação dos PARs. Eles acreditam que o principal mediador do relaxamento e hiperpolarização dependente do endotélio é o próprio NO (COHEN *et al.*, 1997; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006).

A compreensão da multiplicidade de ações decorrentes da liberação de NO pelo endotélio e suas propriedades, aliada às novas análises dos resultados obtidos em vasos de diferentes calibres, pode atenuar ou extinguir as aparentes controvérsias usualmente encontradas nos trabalhos estudados. Podem-se tomar como exemplo dois trabalhos: no primeiro foi relatado que a ouabaína não inibiu a vasodilatação mediada pela bradicinina via EDHF (QUINARD *et al.*, 1999); no segundo, BÉNY & SCHAAD (2000) conseguiram demonstrar que a ouabaína inibia o efeito vasodilatador da bradicinina embora de forma lenta e dose dependente. A diferença entre os dois trabalhos foi o tempo e a dose utilizada, o que levou o primeiro grupo a relatar uma informação aparentemente equivocada. Outros

aspectos destes trabalhos ainda deveriam ser avaliados, pois podem ocasionar resultados muito diferentes. Por exemplo, o sistema vascular estudado foi da mesma espécie animal? Os vasos estudados foram do mesmo calibre?

Trabalhos recentes sugerem que o K^+ é um dos EDHFs, ou ainda, que o K^+ está muito relacionado à atividade dos EDHFs (KAWABATA *et al.*, 2004; MCNEISH *et al.*, 2005). De qualquer forma, quando se analisam trabalhos que visam elucidar o mecanismo de ação de diversos agonistas responsáveis pela vasodilatação dependente do endotélio (GUPTA *et al.*, 1995; COHEN *et al.*, 1997; BÉNY & SCHAAD, 2000; TARE *et al.*, 2000; STRANDE *et al.*, 2007; RASTELLI *et al.*, 2007), fica impossível não cogitar a participação do potencial de membrana no efeito vasodilatador induzido pela gioxina e que essa via poderia ser mediada pela $Na^+K^+ATPase$.

Esta hipótese ficou ainda mais plausível após analisar os resultados apresentados por vários autores (BÉNY & SCHAAD, 2000; NELLI *et al.*, 2003; BATEMBURG *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2006 e RASTELLI *et al.*, 2007), os quais demonstraram que o efeito vasodilatador induzido por bradicinina, que é dependente do endotélio e mediado principalmente pela liberação de NO, foi abolido em artérias após tratamento com ouabaína ou L-NAME.

Os resultados com estes inibidores testados neste trabalho sugerem que a gioxina atua primeiramente no receptor PAR-1 induzindo a liberação de óxido nítrico, seguindo uma seqüência de eventos comumente relatada em outros trabalhos (DÉRY *et al.*, 1998; BATEMBURG *et al.*, 2004; COUGHLIN^b, 2005; LEWIS *et al.*, 2006; RASTELLI *et al.*, 2007), com a ativação do PAR-1, que promove a dissociação da subunidade $G\alpha$ que se liga e ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC catalisa o fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) dando origem ao trifosfato de inositol (IP₃). O IP₃ induz a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citoplasma. O aumento da concentração de cálcio ativa a óxido nítrico sintase endotelial levando a produção de óxido nítrico e a ativação dos canais de potássio ativados por cálcio (possivelmente o SK e IK) o que leva a hiperpolarização da célula endotelial. O óxido nítrico produzido, a hiperpolarização e o potássio acumulado no espaço mioendotelial agirão nas células do músculo liso adjacentes via $Na^+K^+ATPase$, canais de potássio ativados por cálcio ou pelo acoplamento elétrico com as células

endoteliais através das junções gap mioendoteliais, induzindo, finalmente, o relaxamento do músculo liso vascular.

FERNANDES DE LIMA *et al.* (2006) propuseram que a gioxina atua na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ retardando o transporte de íons e modulando a glicólise. Utilizando o modelo *in vitro* de registro da propagação de ondas excitatórias na retina, observaram que o efeito da gioxina sobre o metabolismo é similar ao que ocorre quando há uma diminuição da temperatura de 30°C para 20°C e, que a propagação da onda excitatória é similar à da ouabaína em baixas doses, no entanto, o final é diferente. A gioxina é pouco tóxica para a retina e em doses baixas parece ter um efeito protetor. A ouabaína mata a retina em doses de 10 nmolL^{-1} e seu efeito é de excitotoxicidade prolongada com alta atividade do cálcio intracelular, o que leva a lise do tecido.

A trombina tem diversas propriedades inflamatórias das quais podemos citar degranulação celular, quimiotaxia, liberação de citocinas e aumento na permeabilidade vascular. Dentre estas atividades, a mais relacionada aos receptores PARs é a quebra na barreira endotelial (FEISTRITZER & RIEWALD, 2005; NIESSEN *et al.*, 2009). Os ensaios com microscopia intravital e de alteração da barreira hematoencefálica permitiram verificar se estas atividades também poderiam ser exercidas pela gioxina.

As análises por microscopia intravital permitiram observar e quantificar os leucócitos polimorfonucleares (PMN), que formam as principais linhas fagocíticas de defesa contra os microrganismos que ganham acesso à circulação sistêmica. A habilidade destas células em reconhecer sítios de infecção vascular, aderir-se a parede do vaso e migrar, é um dos primeiros eventos da resposta inflamatória. O rolamento, adesão, extravasamento e migração permitem aos fagócitos alcançar os sítios de invasão de patógenos.

Os mediadores inflamatórios que atuam nos receptores acoplados a proteína G, como a trombina, promovem um aumento na permeabilidade endotelial, principalmente através do aumento na concentração de Ca^{2+} . Este aumento de Ca^{2+} ativa alguns processos metabólicos chaves que mediam a reorganização do citoesqueleto. O aumento na permeabilidade da barreira endotelial induzido por agonistas dos receptores endoteliais é o primeiro sinal inflamatório envolvido no

edema vascular (FEISTRITZER *et al.*, 2005). No entanto, nos pacientes acidentados por cascavel o edema no local da picada é desprezível (FUNASA, 2001).

A trombina é capaz de induzir o rolamento de leucócitos e a adesão ao leito vascular por meio de um mecanismo envolvendo os receptores PAR-1 e PAR-4 (VERGNOLLE *et al.*, 2002). No entanto, estes dois parâmetros não foram alterados após a aplicação tópica de gioxina, o que sugere que a resposta inflamatória com este agonista não seja semelhante à da trombina.

As divergências ocorridas entre experimentos envolvendo receptores PARs e seus possíveis antagonistas são relativamente comuns, pois como referido anteriormente, a sinalização subsequente à ativação destes receptores pode diferir muito, de acordo com a espécie, tipo ou linhagem celular, tempo de incubação, agonista e concentração utilizada, o mesmo valendo para os antagonistas (KAHN *et al.*, 1999; AHN *et al.*, 2000; HOLLENBERG & SAIFEDDINE, 2001; LI *et al.*, 2005). Estas variações motivaram a avaliação da participação dos PARs 1 e 4 na sinalização celular induzida pela gioxina em outro sistema biológico, ou seja, na agregação de plaquetas humanas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a gioxina ativa plaquetas humanas e que esta interação é mediada, ao menos em parte, pelos receptores PARs 1 e 4. O melhor ajuste das curvas cinéticas obtido nestes grupos foi utilizando-se uma equação não linear com dois sítios. Considerando que a atividade do receptor PAR-4 é muito mais lenta do que a do PAR1 (COVIC *et al.*, 2000), pode-se supor que a presença dos inibidores permitiu evidenciar a participação dos dois receptores neste processo.

Em contraste ao ocorrido nos experimentos por microscopia intravital, nos quais foi demonstrada a inibição total da vasodilatação após tratamento com o inibidor do receptor PAR-1, a agregação plaquetária não foi abolida nem mesmo ao se utilizar dois inibidores simultaneamente: o SCH 79797 e o tcY-NH₂, inibidores dos receptores PAR-1 e PAR-4, respectivamente. Duas possibilidades podem explicar este resultado: a dose dos agonistas (trombina e gioxina) e a participação de outros receptores/fatores que agregam as plaquetas.

As doses do SCH 79797 e tcY-NH₂ escolhidas para inibição da agregação plaquetária foram as mesmas utilizadas por LI *et al.* (2005). Os autores relataram

que ambos os inibidores apenas atenuaram, de forma significativa, a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina, principalmente quando utilizados ao mesmo tempo. Estes resultados são similares aos obtidos neste trabalho, pois nem o SCH 79797 ou o tcY-NH₂ ou a associação de ambos, aboliram totalmente a agregação plaquetária induzida pela gioxina e pela trombina (aplicadas após uma hora de incubação com os inibidores). A agregação residual pode ser decorrente da atuação da trombina ou gioxina em outros receptores presentes na superfície celular. Em um trabalho recente LOMBARDI *et al.* (2004) relataram que a agregação plaquetária induzida por trombina é mediada pela clivagem dos receptores PARs e pela ligação da trombina com o complexo glicoprotéico GPIb-IX-V. A trombina cliva também a GP-V, o que subsequente dá início a uma via não proteolítica para indução da agregação plaquetária promovida pela trombina ao ligar-se a GPIb α . O resultado da estimulação desse complexo é a mudança da forma discóide da plaqueta para a esférica e a liberação dos grânulos alfa e lisossomais, o que leva a um maior potencial de agregação e ao início da contração plaquetária (ANDREWS *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos destacam a atuação dos PARs na integridade e atividade das células neurais (TURGEON & HOUENOU, 1997; ROHATGI *et al.*, 2004), assim como destacam a atuação na morfologia de astrócitos, que são células componentes da barreira hematoencefálica juntamente com as células endoteliais. Como mencionado anteriormente, a trombina altera a permeabilidade da barreira endotelial, o que permite a entrada de diferentes moléculas para o meio intersticial (NGUYEN *et al.*, 1997; VERGNOLLE *et al.*, 2002; FEISTRITZER *et al.*, 2005; NIESSEN *et al.*, 2009). A análise dos trabalhos citados sugeriram que as alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica induzidas pela gioxina podem estar relacionadas à sua atividade sobre os PARs.

A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais, astrócitos e pela membrana vascular. Caso a gioxina atue via receptores PARs e ocasione aumento na permeabilidade endotelial, não só o produto de sua atividade enzimática, mas também outras moléculas poderiam alcançar as células neuronais.

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).

Nos ensaios realizados neste trabalho utilizando camundongos foi possível constatar a alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os animais tratados com giroxina apresentaram permeabilidade aumentada, isso permitiu a entrada do complexo albumina-Azul de Evans no cérebro. Este aumento de permeabilidade na barreira foi passageiro e teve seu auge em até 15 minutos, o que coincide com o intervalo no qual, geralmente, acontecem as manifestações neurotóxicas (rolamento em barril). Cabe ainda ressaltar que a dose utilizada nos experimentos para analisar a quebra na barreira foi a mesma utilizada nas análises de confirmação de atividade neurotóxica.

Este fato confirma pela primeira vez a atuação da giroxina na permeabilidade da BHE. A alteração na permeabilidade induzida pela giroxina ocorre nos minutos iniciais e, de forma semelhante ao manitol, é reversível, pois após 30 minutos a presença do Azul de Evans não é mais detectada.

Este resultado corrobora com sintomas neurotóxicos observados em camundongos, pois o rolamento em barril ocorre nos primeiros minutos após a administração da giroxina, com maior frequência entre 3 e 5 minutos. Após 30 minutos, geralmente, o animal está em recuperação e não apresenta mais rolamentos. A dose de 0,25 µg/g de giroxina não é letal, porém, em alguns casos alguns animais morrem nos minutos iniciais após injeção e os que sobrevivem não ficam com seqüelas visualmente observáveis.

A atividade neurotóxica da giroxina ainda não foi completamente elucidada. Até o momento, não se sabe se os receptores PARs têm alguma participação no mecanismo de ação dessa síndrome. 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 uma síndrome neurotóxica semelhante a apresentada por camundongos tratados com giroxina, o rolamento em barril, no entanto, é importante lembrar que todas essas substâncias citadas apenas desencadeiam esta síndrome

quando administradas via intracerebroventricular, diferentemente da giroxina 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 giroxina 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.

Em suma, como contribuição inédita do presente trabalho, observou-se que a giroxina ativa os receptores acoplados a proteína G, o PAR-1 e PAR-4 e induz alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Neste trabalho também são apresentadas evidências de que a giroxina induz a agregação plaquetária e vasodilatação mediada pelos PARs, óxido nítrico e Na⁺K⁺ATPase.

7 CONCLUSÕES

- Os ensaios com microscopia intravital em camundongos “Swiss” nos permite afirmar que na presença da gioxina ocorre um aumento significativo do diâmetro dos microvasos, constatando *in vivo* sua atividade vasodilatadora;
- O receptor ativado por protease 1 (PAR1) está envolvido na via utilizada pela gioxina para induzir a vasodilatação, pois esta atividade foi suprimida na presença do inibidor específico;
- O óxido nítrico e a Na⁺K⁺ATPase também estão envolvidos na capacidade da gioxina em induzir vasodilatação, pois a utilização de inibidores específicos (L-NAME e oubaína), aboliram esta atividade;
- A gioxina atua na hemostasia agindo sobre o fibrinogênio, mas também induzindo a agregação plaquetária;
- Os receptores PAR1 e PAR4 estão envolvidos no mecanismo de ação da gioxina na agregação plaquetária, já que esta foi diminuída na presença dos inibidores específicos (SCH79797 e tcY-NH₂);
- A permeabilidade da barreira hematoencefálica foi aumentada após injeção intravenosa de gioxina, sendo um fenômeno reversível em aproximadamente 30 minutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, H.; FOSTER, C.; BOYKOW, G.; STAMFORD, A.; MANNA, M.; GRAZIANO, M. Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. **Bioch. Pharmacol.** v. 60, p. 1425-1434. 2000.
- 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.
- ALVES DA SILVA, J.A., MURAMOTO, E., RIBELA, M.T.C.P., ROGERO, J.R., CAMILLO, M.A.P. Biodistribution of gyroxin using 125-iodine as radiotracer. **J. Radioanal. Nucl. Chem.** v. 269, n. 3, p. 579-583. 2006.
- ALVES DA SILVA, J.A., Aspectos estruturais e de atividade biológica da giroxina (enzima trombina símile) do veneno da cascavel brasileira, *Crotalus durissus terrificus*. **Dissertação** (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ANDREWS, R.K.; MUNDAY, A.D.; MITCHELL, C.A.; BERNDT, M.C. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. **Blood**. v. 98, p. 681-687. 2001.
- KUNKEL, E.J.; DUNNE, J.L.; LEY, K. Leukocyte Arrest During Cytokine-Dependent Inflammation. **J Immunol.** v. 164, p. 3301–3308, 2000.
- BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microv. Res.** v. 5, p. 384-394, 1973.
- 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**, p. 113-133. 1978.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Ac. Physiol. Latino.** v.11, p. 224, 1961.
- BATENBURG, W.W.; POPP, R.; FLEMING, I.; DE'VRIES, R.; GARRELD, I.M.; SAXENA, P.R.; DANSER, A.H.J. **Br J. Pharmacol.** v. 142, p. 125–135. 2004.

- BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. **Physiol. Rev.** v. 84, p. 869-901. 2004.
- BOUGHARIOS, G. PONTICOST, M.; RAJKUMAR, V.; ABRAHAM, D. Extracellular matrix in vascular networks. **Cel. Prolif.** v. 37, p. 207-220. 2004.
- BEDNAR, B.; CONDRA, C.; GOULD, R.J.; CONNOLLY, T.M. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. **Throm. Res.** v. 77, n 5, p. 453-463. 1995.
- BÉNY, J.L. & SCHAAD, O. An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. **Br J. Pharmacol** v. 131, p. 965-973. 2000.
- 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., JAY, W. Kallikrein-like Enzymes from *Crotalus atrox* Venom. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 258, n. 20, p. 12566-12573. 1983.
- BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, S.J.; EDELSTEIN, S.J. **Prot. Meth.** 2 ed. cap. 3, p. 62-67. 2002.
- BOLOTINA, T.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. **Nature.** v. 368, p. 850-853. 1994.
- BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Mielinização, desmielinização e remielinização no SNC: aspectos histofisiológicos relevantes à formação e integridade da mielina central. **Revista Institucional Ciência e Saúde.**16:103-111. 1998.
- 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 44. n. 3, p. 133-138. 2002.
- BUNDGAARD, H.; FALCH, E.; LARSEN, C.; MIKKELSON, T. Pilocarpine prodrugs I. Synthesis, physicochemical properties and kinetics of lactonization of pilocarpic acid esters. **J. Phar. Sci.** v.75, p.36-43, 1986.

- 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.
- CAMPOS, LUCELIA DE A.; SILVA, MURILO C. DA; SPENCER, PATRICK J. Isolation and characterization of delta toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Evento VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia - Angra dos Reis (RJ) - 19 a 23 de setembro p. 36** Publicação Evento Científico - Resumo - Nacional – 2006.
- 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? **Bioch. Biophys. Acta**. v. 1547, n. 2, p. 183-95. 2001.
- CLISSA, P.B.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M.S.; FARSKY, S.H.; MOURA-DASILVA, A.M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**. v. 47, p. 591-591. 2006.
- COHEN, R.A.; PLANE, F.; NAJIBI, S. Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of rabbit carotid artery. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v. 94, p. 4193-4198. 1997.
- COHN, M.L.; COHN, M. Barrel rotation induced by somatostatin in the non-lesioned rat. **Brain Res**. v. 96, n. 1, p. 138-141. 1975.
- COOMBER, B.L.; STEWART, P.A. Three-dimensional reconstruction of vesicles in the endothelium of blood-brain barrier versus highly permeable microvessels. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**. v. 215, p. 256-261. 1986.
- COVIC, L.; GRESSER, A.L.; TALAVERA, J.; SWIFT, S.; KULIOPULOS, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 99, p. 643-648. 2002.
- COUGHLIN^b, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **J. Thr. Haem.** v. 3, p. 1800–1814. 2005.
- CUFF, J.A.; BARTON, G.J. Application of Multiple Sequence Alignment Profiles to Improve Protein Secondary Structure Prediction. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**. v. 40, p. 502–511. 2000.

- DAMPNEY, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.** v. 74, p. 323-364. 1994.
- DA SILVA, N.J.; AIRD, S.D. SEEBART, C. & KAISER, I.I.. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). **Toxicon** , v.27, n.7, p.763-771, 1989.
- D'AMICO, M.; BERRINO, L., MAIONE, S.; PIZZIRUSO, A.; ROSSI, F. Effects of L-NAME on endothelin-I-induced barrel-rolling in periaqueductal gray area of rats. **Life Sci.** v.57, PL357-PL360. 1995.
- DIAMANT, M.; BAARS, A.M. ; KOVÁČX, G. L.; DE WIED, D. Barrel rotation induced by central arginine-vasopressin treatment: involvement of neurohypophyseal peptide receptors. **Phar. Bioch. Beh.** v. 47, p. 27-32, 1994.
- ESNOUF, M.P.; TUNNAH, G.W. The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Agkistrodon rti* venom. **Br J. Haem.** v. 13, p. 581. 1967.
- FEISTRITZER, C.; RIEWALD, M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. **Blood.** v. 15, n. 105(8), p. 3178-3184. 2005.
- FEISTRITZER, C.; LENTA, R.; RIEWALD, M. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. **J. Thr. Haem.** v. 3, p. 2798–2805. 2005.
- FERSHT, A. The structures and mechanisms of selected enzymes. Enzymes structure and mechanism. **New York, USA. W.H. Freeman and Company**, 1985, p.405-413.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where are we now? **Art, Thr Vasc. Bio.** . v. 26, p. 1215-1225. 2006.
- FONSECA, F.V. Isolamento e Caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. **Tese** (Doutorado) – f Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia – Departamento de Bioquímica. Campinas, São Paulo. 2005.
- FÖRSTER, C.; WASCHKE, J.; BUREK, M.; LEERS, J.; DRENCKHAHN. Glucocorticoid Effects on Mouse Microvascular Endothelial. **J. Phy.** v. 573, n. 2, p. 413–425 2006.
- FÖRSTER, C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. **Hist. cell bio.** v. 130, n. 1, p. 55-70. 2008.

- FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.
- GARLAND, C.J.; PLANE, F.; KEMP, B.; COCKS, T. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Trends in Pharmacology Sciences**. v. 16, p. 23-30.1995.
- GUAN, J.; SUN, S.; CAO, X.; CHEN, Z. Experimental study on the PAR-1 expression around hemotoma following intracerebral hemorrhage in rats. **Journal of Huazhong University of Science and Technology -- Medical Sciences --**. v. 24, p. 266–268. 2004.
- GUPTA, S.; MORELAND, R.B.; MUNARRIZ, R.; DALEY, J., GOLDSTEIN, I.; DE TEJADA, I. Possible role of Na^+,K^+ ATPase in the regulation of human corpus cavernosum smooth muscle contractility by nitric oxide. **Br J. Pharmacol** v. 116, p. 2201-2206. 1995.
- HATTON, M.W.C. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rti* venom. **Bioc. Journal**. v. 131.799. 1973.
- HASHIZUME, J.L.; CAMILLO, M.A.P. Ação da gioxina em células endoteliais em cultura. In: **13 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**. Resumos do 13 SIICUSP-Ribeirão Preto/SP. v. 1 p. 3806. 2005.
- HIRANO, K. The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Biol**. v. 27, p. 27-36. 2007.
- HODGSON, W.C.; ISBISTER, G.K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. **Current Opinon in Pharmacology**. v. 9, p. 173–176. 2009.
- HOLLEMBERG, M.D.; SAIFEDDINE, M. Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): activation and inhibition of rat platelet aggregation by PAR4-derived peptides. **Can. Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 79, p. 439–442. 2001.
- HOOPER, N.M. **Proteases in Biology and Medicine**. v. 38. chap. 1. London. UK. Portland Press. ISBN 1855781476. 2002.
- HUANG, E.; CHEN, Y-K.; TAG, 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. Fibrinolytic 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.
- JANZER, R.C.; RAFF, M.C.; Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. **Nature**. v. 325, p. 253-257. 1987.
- KAHN, M.L.; NAKANISHI-MATSUI, M.; SHAPIRO, M.J.; ISHIHARA, H.; COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. **The Journal of Clinical Investigation**.v. 103, p. 879–887. 1999.
- KANNAN, H.; TANAKA, H.; UETA, Y.; HAYASHIDA, Y.; KUNITAKE, T.; YAMASHITA, H. Effects of centrally administered endothelin-3 on renal sympathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. **Journal of 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. **Japanese Journal Pharmacology**. v. 82, p. 171-174. 2000.
- KAWABATA, A.; KUBO, S.; ISHIKI, T.; KAWAO, N.; SEKIGUCHI, F.; KURODA, R. Proteinase-activated receptor-2-mediated relaxation in mouse tracheal and bronchial smooth muscle: signal transduction mechanisms and distinct agonist sensitivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2004;311:402–410.
- KAWABATA, A.; KAWAO, N. Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (PARs): PARs in the Respiratory System: Cellular Signaling and Physiological /Pathological Roles. **Journal of Pharmacological Sciences**. p. 20 – 24, 2005.
- 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.
- KATAOKA, H.; HAMILTON, J.R.; MCKEMY, D.D.; CAMERER, E.; ZHENG, Y.W.; COUGHLIN^c, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. **Blood**. n. 9, v. 102, p. 3224-3231. 2003.
- KAYA, M.; PALANDUZ, A.; KALAYCI, R.; KEMIKLER, G.; SIMSEK, G.; BILGIC, B.; AHISHALI, B.; ARICAN, N.; KOCYILDIZ, Z.C.; ELMAS, IMDAT KUCUK, M.; KARADENIZ, A. Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood-brain barrier and astrocytes. **Brain Res**. 1092, 105-112. 2004.

- KIM, Y.V.; CELLO, F.; HILLAIRE, C.S.; KIM, K.S. Differential Ca²⁺⁺ signaling by thrombin and protease-activated receptor-1-activating peptide in human brain microvascular endothelial cells, **American Journal of Physiology**. v. 286, p. C31–C42, 2004.
- 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.
- 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.
- KOZLER, P., POKORNY, J. Altered blood-brain barrier permeability and its effect on the distribution of evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. **Physiological Research**. 52, 607-614. 2003.
- KRUSE, H.; VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.J.B.; WIEDA, D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 7, n. 4, p. 311-313. 1977.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-5, 1970.
- LARAGH, J.H. Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. **The New England Journal of Medicine**. v. 21, n. 313, p. 1330-1340. 1985.
- LEIBOWITZ, S.; HUGHES, R.A.C. Immunology of the Nervous System. **E. Arnold Publishers**, London. 1983.
- LEWIS, S.J.; TRAVIS, M.D.; HASHMI-HILL, M.P.; SANDOCK, K.; ROBERTSON, T.P.; BATES, J.N. Differential effects of ouabain on the vasodilator actions of nitric oxide and S-nitrosothiols in vivo: Relevance to the identity of EDRF/EDHF. **Vascular Pharmacology**. v. 45, p. 383-394. 2006.
- LI, M.; PERINI, R.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; KLEIN, A.; HOLLENBERG, M.D.; WALLACE, J.L. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n. 1, p. 216-220. 2005.

- LOMBARDI, R.; CATTANEO, M.; SINIGAGLIA, C.B.; TORTI, M. Contribution of Protease-activated Receptors 1 and 4 and Glycoprotein Ib-IX-V in the Gi-independent Activation of Platelet Rap1B by Thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 24, p. 25299-25306. 2004.
- LOZADA, A.F.; AARNISALO, A.A.; KARLSTEDT, K.; STARK, H.; PANULA, P. Plasticity of histamine H3 receptor expression and binding in the vestibular nuclei after labyrinthectomy in rat. **BMC Neuroscience**. v. 10, p. 32. 2004.
- MAGALHÃES A, DA FONSECA BC, DINIZ CR, GILROY J, RICHARDSON M. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS Lett**. v. 329, n. 1, p. 116-120. 1993.
- MARKLAND, F.S. Snake venom and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800. 1998.
- MARKLAND, F.S.; DAMUS, P.S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). **Journal of Biological Chemistry**. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A, v 79, p.1688. 1982.
- MCNEISH, A.J.; DORA, K.A.; GARLAND, C.J. Possible role for k⁺ in endothelium-derived hyperpolarization factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery. **Stroke**. v. 36, p. 1526-1532. 2005.
- MISAKI, T.; SATOH, Y.; SAINO, T.; OGAWA, A. The role of protease-activated receptors on the intracellular calcium ion dynamics of vascular smooth muscles, with special reference to cerebral arterioles. **Archives of Histology and Cytology**. v. 69, n. 1, p. 49-60. 2006.
- MUKHERJEE, A.K.; GHOSAL S.K.; MAITY, C.R. Some biochemical properties of Russell's viper (*Daboia russelli*) venom from Eastern India: correlation with clinical pathological manifestation in Russell's viper bite. **Toxicon**. v. 38, p. 163–175. 2000.

- NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**. v. 107, n. 4, p. 1102–1107. 1992.
- NELLI, S.; WILSON, W.S.; LAIDLAW, H.; LLANO, A.; MIDDLETON, S.; PRICE, A.G.; MARTIN, W. Evaluation of potassium ion as the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the bovine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**. v. 139, p. 982–988. 2003.
- NGUYEN, L.T.; LUM, H.; TERUPPATHI, C.; MALIK, A.B. Site-specific thrombin receptor antibodies inhibit Ca²⁺ signaling and increased endothelial permeability. **American Journal of Physiology**. v. 273, n. 5 Pt 1, p. C1756-63. 1997.
- NIESSEN, F.; FURLAN-FREGUIA, C.; FERNÁNDEZ, J.A.; MOSNIER, L.O.; CASTELLINO, F.J.; WEILER, H.; ROSEN, H.; GRIFFIN, J.H.; RUF, W. Endogenous EPCR/aPC-PAR1 signaling prevents inflammation-induced vascular leakage and lethality. **Blood**. v. 113, n. 12, p. 2859-2866. 2009.
- NOORBAKHSH, F.; VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M.D.; POWER, C. Proteinase-activated receptors in the nervous system. **Nature reviews**, v. 4, p. 981-990. 2003.
- OGUIURA, N., BONI-MITAKE, M., RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**. n. 45, p. 363-370. 2005.
- 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.
- PATTERSON, C.; STOUFFER, G.A.; MADAMANCHI, N.; RUNGE, M.S. New tricks for old dogs – Nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. **Circulation Research**. v. 88, p. 987-997. 2001.
- QUIGNARD, J.F.; FÉLÉTOU, M.; THOLLON, C.; VILAINE, J.P.; DUHAULT, J.; VANHOUTTE, P.M. Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarization factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. **British Journal of Pharmacology**. v. 127, p. 27-34. 1999.
- RASMUSSEN, U.B.; VOURET-CRAVIARI, V.; JALLAT, S.; SCHLESINGER, Y.; PAGERS, G.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; POUYSSEGUR, J.; VAN OBERGHEEN-SCHILLING, E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-

- thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. **Journal Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**. v. 288, p. 123–128. 1991.
- RASTELLI, V.M.F.; OLIVEIRA, M.A.; SANTOS, R.; PASSAGLIA, R.C.T.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B. Lack of potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) in a type 2 diabetes model: Role of insulin. **Peptides** 28, p. 1040-1049. 2007.
- 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*. **BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH**. v. 19, p. 333-338, 1986.
- REESE TS, KARNOVSKY MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. **The Journal of Cell Biology**. 34:207-217. 1967.
- RISAU W. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 405m p. 405-419. 1991.
- ROHATGI, T.; HENRICH-NOACK, P.; SEDEHIZADE, F.; GOERTLER, M.; WALLECH, C.W.; REYMANN, K.G. REISER, G. Transient focal ischemia in rat brain differentially regulates mRNA expression of protease-activated receptors 1 to 4. **Journal of Neuroscience Research**. v. 75, p. 273–279. 2004.
- SAMBRANO, G.R.; WEISS, E.J.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W.; COUGHLIN, S.R. Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. **NATURE**. n. 413, p. 74-78. 2001.
- SANTOS, S.M. SERRANO, A. KULIOPULOS AND S. NIEWIAROWSKI, Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **Journal Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**. v. 477, p. 199–202. 2000.
- SERRANO, S. & MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, n. 8, p. 1115–1132. 2005.
- SEKI C, VIDAL JC, BARRIO A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**. v.18, n. 3, p. 235-247. 1980.
- SEKIGUCHI, F; TAKAOKA, K.; KAWABATA, A. Proteinase-activated receptors in the gastrointestinal system: a function linkage to prostanoids. **Inflammopharmacology**. v. 15, p. 246-251. 2007.

- SHAPIRO, M.J.; WEISS, E.J.; RARUQI, T.R.; COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 33, p. 25216-2521. 2000.
- SHEPHERD, J.T. Reflex control of arterial blood pressure. **Cardiovasc Research**. v. 16, n. 7, p. 357-370. 1982 .
- SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 28, p. 703-711. 1996.
- STERNBERG, E.M. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. **Progress in Brain Research**. v. 122, p. 35-42. 2000.
- STEWART P.A.; COOMBER, B.L. Astrocytes and the blood-brain barrier. In Fedoroff S, Verdanakis A (eds.). Astrocytes: development, morphology and regional specializations of astrocytes. **London: Academic Press**. 311-323. 1986.
- STRANDE, J.L.; HSU, A.; SU, J.; FU, X.; GROSS, G.J.; BAKER, J.E. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. **Basic Res Cardiol**. v. 102, p. 350–358. 2007.
- SONG, S.J.; PAGEL, C.N.; CAMPBELL, T.M.; PIKE, R.N.; MACKIE, E.J. The role of protease-activated receptor-1 in bone healing. *Am J Pathol*. 2005;166:857–868. The role of protease-activated receptor-1 in bone healing. **American Journal of Pathology**. v. 166, p. 857-868. 2005.
- SUO, Z.; CITRON, B.A.; FESTOFF, B.W. Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**. v. 3, p. 105-114. 2004.
- TARE, M.; PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H.A. EDHF, NO and prostanoid: hyperpolarization-dependent and –independent relaxation in guinea-pig arteries. **British Journal of Pharmacology**. v. 131, p. 605-618. 2000.
- TORRENT, R.M.R.; BONGIOVANNI, B.; LEIVA, L.C.; DUFFARD, A.M. E.; RODRÍGUEZ, J.P.; PÉREZ, O. C.A. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated

- from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**. v. 50, n. 1, p. 144-152. 2007.
- 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.
- UTAISINCHAROEN, P.; MACKESSYN, S.P.; MILLER, R.A.; TUS, A.T. Complete primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 29, p. 21975-21983. 1993.
- VERGNOLLE, N.; DERIAN, C.K.; D'ANDREA, M.R.; STEINHOFF, M.; ANDREA-GORDON, P. Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: A Potential Proinflammatory Role for Proteinase-Activated Receptor. **The Journal of Immunology**. v. 169, p. 1467-1473. 2002.
- VU, T.K.; HUNG, D.T.; WEATHON, V.I.; COUGHLIN, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. v. 64, p. 1057-1068. 1991.
- Wang, Y.; Zhou, Y.; Szabo, K.; Haft, C. R. Trejo, J. Down-Regulation of Protease-activated Receptor-1 Is Regulated by Sorting Nexin 1. **Molecular Biology of the Cell**. v. 13, p. 1965–1976 2002.
- WATTS, V.L.; METLEY, E.D. Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. **Experimental Biology and Medicine**. v. 234, n. 2, p. 132-139. 2009.
- WEATHERALL, D. Endothelium, NO and atherosclerosis. Oxford Textbook of medicine - Medicine and health – Cardiovascular approaches. ed. Oxford USA TRADE. **ISBN 0198569785**. v. 3. p. 52. 2005.
- WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**. 1969 Aug 25;244(16):4406-12.. Weber K, Osborn M.
- WIELDERS, S.J.; BENNAGHMOUCH, A.; REUTELINGSPERGER, C.P.; BEVERS, E.M.; LINDHOUT, T. Anticoagulant and antithrombotic properties of intracellular protease-activated receptor antagonists. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 5, p. 571-576. 2007.

- WILLCOX, B.J., POULIN, P., VEALE, W.L., PITTMANM Q.J. Vasopressin-induced ^ motor effects: localization of a sensitive site in the amygdala. **Brain Research.**, v.596, n. 0 1-2, p. 58-64, 1992.
- WURPEL, J.D.; DUNDORE, R.L; BARBELLA,Y.R.; BAUBAN, CD. ; KEIL, LC ; SEVERS, W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. I. Description and general pharmacology. **Brain Research.**, V.365, p.21-29, 1986a.
- WURPEL,J.D.; DUNDORE,R.L.; BARBELLA,Y.R.; BALABAN,CD, ; KE1L,L.C. & SEVERS,W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. 11 . Visual/ vestibular interactions and efficacy of antiseizure drugs. **Brain Research.** v.365, p. 30-41, 1986b.
- VU, T.K.; HUNG, D.T.; COUGHLIN, S.R. How the protease thrombin talks to cells. *Cell.* v. 64, p. 1057–1068, 1991.
- 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.
- YONAMINE, C.M. Clonagem de serino proteases do veneno da cascavel *Crotalus durissus tefficus* e expressão da giroxina em células de mamífero. **Dissertação** (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paul. 2007.
- YONAMINE, C.M.; PRIETO-DA-SILVA, A.R.B.; MAGALHÃES, G.S.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MORGANTI, L.; AMBIEL, F.C.; CHURA-CHAMBI, R.M.; T. YAMANE; CAMILLO, M.A.P. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon.** v. 54, p. 110-120. 2009.
- YOSHIMURA, T.; ARIMURA, N.; KAIBUCHI, K. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. Cuff Molecular mechanisms of axon specification ad neuronal disorders. **The New York Academy of Sciences** v. 1086, p. 116-125. 2006.

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.