SERGIO AUGUSTO DE LIMA

**Estudo dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e Giroxina isoladas de venenos de
serpentes em cultura de células endoteliais**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2010

SERGIO AUGUSTO DE LIMA

**Estudo dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e Giroxina isoladas de venenos de
serpentes em cultura de células endoteliais**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Farmacologia da
inflamação

Orientadora: Profa. Dra. Catarina de F. P.
Teixeira

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lima, Sérgio Augusto.

Estudo dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e Giroxina isoladas de venenos de serpentes em cultura de células endoteliais / Sérgio Augusto Lima. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Mecanismo de ação de toxinas e venenos de animais.

Versão do título para o inglês: Studies on the effects of the serine proteinases PA-BJ and gyroxin, isolated from snake venoms, on endothelial cells in culture.

Descritores: 1. PA-BJ 2. Giroxina 3. Serinoproteinase 4. Prostaciclina 5. Ciclooxigenase 6. Células endoteliais I. Teixeira, Catarina de Fátima Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB023/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Sérgio Augusto Lima.

Título da Dissertação: Estudo dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e Giroxina isoladas de venenos de serpentes em cultura de células endoteliais.

Orientador(a): Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao nosso Pai Celestial pela oportunidade de estar nessa terra abençoada para desenvolver este projeto.

À minha Mãe, que com muito esforço e dedicação sempre me ajudou e tenho certeza de que sem ela eu não estaria aqui hoje. Obrigado mãe por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me dando forças, para lutar sempre e nunca desistir, obrigado por ser meu exemplo de garra e perseverança, qualidades raras em mulheres que já passaram pelo que você já passou nesta vida.

Ao meu pai, que apesar de não estar aqui entre nós e do pouco tempo que estivemos aqui juntos, me ensinou a ser HOMEM e tenho certeza que de onde ele estiver, sente orgulho de mim.

Ao meu amor por estar do meu lado e me apoiar durante esta jornada.

À Catarina, minha orientadora, que com muita paciência e dedicação me ajudou a ampliar minha capacidade crítica e a fazer ciência com amor e dedicação e a dar valor a cada resultado, a cada caminho novo a ser desvendado, a procurar o infinito, a ver o que os outros não podem ver, com um único propósito ampliar o conhecimento e a ciência para que as gerações futuras tenham um mundo melhor.

Catarina Obrigado!

À tia, Dra. Vanessa, obrigado por sempre me ajudar quando eu precisei, além do que, se hoje estou com esses resultados, é porque um dia você pensou em um projeto.

Ao meu amigo Marcio, apesar de Deus não ter me concedido a oportunidade de conhecer meus irmãos de sangue, ele colocou outros em minha vida e um desse é você meu irmão, obrigado pela ajuda, pelo álcool no fluxo, e se hoje eu trabalho com células *in vitro*, foi porque você me ensinou, obrigado por tudo meu irmão-amigo.

À Pollyana amiga de todas as horas e jornadas, né mano, nós subimos o morro e apesar das cicatrizes, cumprimos nossa obrigação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia - Unidade de Inflamação do Instituto Butantan, Elbio, Marlos, Neide, Cristina, Renata, Silvia, Jean, Eduardo, Marcela e Mariana, obrigado pelo apoio que sempre me deram para a realização deste trabalho.

À Dra. Solange M. T. Serrano e ao Dr. Andreimar M. Soares pelo fornecimento das toxinas.

À equipe da secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia, Fábiana, Marcos e Eliane, pela eficiência e simpatia, toda vez que precisei, muito obrigado!

Ao Instituto Butantan, à Universidade de São Paulo e seus funcionários pela disponibilidade, atenção e oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 06/58335-4).

***“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem -
mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir”***

Albert Einstein

RESUMO

LIMA, S. A. **Estudo dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e Giroxina isoladas de venenos de serpentes em cultura de células endoteliais.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O envenenamento causado pelas serpentes da família Viperidae é caracterizado por distúrbios graves da coagulação sanguínea, com subsequente comprometimento do endotélio. Dentre os componentes desses venenos, as serinoproteinases são as principais enzimas envolvidas nas alterações da hemostasia, decorrentes do envenenamento. Entretanto, seus efeitos no endotélio ainda não são conhecidos. A partir dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* foram isoladas as serinoproteinases PA-BJ e giroxina, respectivamente. A PA-BJ induz agregação plaquetária, por meio da ativação de receptores PAR-1 e -4 (*proteinase activated receptor-1 and -4*), que são também ativados pela trombina. A giroxina, além de sua ação no sistema nervoso central, possui atividade coagulante sobre o fibrinogênio, à semelhança da trombina. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da PA-BJ e da giroxina sobre células endoteliais (CEs), em cultura, quanto à: a) viabilidade celular, b) integridade das monocamadas, c) liberação de prostaciclina (PGI₂) e o mecanismo envolvido neste efeito. Os resultados obtidos demonstram que a PA-BJ e a giroxina, não alteram a viabilidade nem a integridade das monocamadas de CEs, nas concentrações e períodos de incubação avaliados. No entanto, estas serinoproteinases induziram, na maior concentração, a liberação de PGI₂, após 24 h de incubação. A trombina, utilizada como controle positivo deste estudo, causou o mesmo efeito. O pré-tratamento das monocamadas de CEs com inibidores seletivos e não seletivos das ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e -2), reduziu a liberação de PGI₂ induzida tanto pela PA-BJ quanto pela giroxina ou a trombina, em relação aos respectivos controles. Por outro lado, a incubação das CEs com a PA-BJ ou a giroxina não afetou a expressão protéica da COX-1 nem da COX-2 pelas CEs. Adicionalmente, o pré-tratamento das células com um antagonista do receptor PAR-1 e a inibição da atividade catalítica das serinoproteinases, não afetaram a liberação de PGI₂, no endotélio, induzida pelas serinoproteinases em estudo. Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram que as serinoproteinases PA-BJ e giroxina induziram a liberação de PGI₂ por estas células e este efeito mostrou-se dependente, ao menos em parte, da ativação dos sistemas enzimáticos da COX-1 e COX-2. E esse efeito independe da ativação de receptores PAR-1 e da atividade catalítica dessas serinoproteinases.

Palavras-chave: Serinoproteinases; PA-BJ; Giroxina; Prostaciclina; Ciclooxygenases; Células endoteliais.

ABSTRACT

LIMA, S. A. **Studies on the effects of the serine proteinases PA-BJ and gyroxin, isolated from snake venoms, on endothelial cells in culture.** 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The disturbances in blood clotting are among the most dramatic effects of envenomation by viperid snakes. Venom serine proteinases are involved in proteolytic events, causing disturbances on haemostasis observed upon envenomation. However, their effects on endothelial cells (ECs) are still unknown. PA-BJ and gyroxin are serine proteinases isolated from *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms, respectively. PA-BJ induces platelet aggregation mediated by proteinase activated receptors -1 and -4 (PAR -1 and -4), which are also activated by thrombin. Gyroxin, in turn, acts on central nervous system, and produces clotting on fibrinogen. In this study, the effects of PA-BJ and gyroxin on endothelial cells in culture were investigated, evaluating: a) ECs viability and monolayers integrity; b) release of prostacyclin (PGI₂) and the mechanism involved in this effect. PA-BJ and gyroxin, at the highest concentration, neither affected the integrity of monolayers nor modified ECs viability in the tested periods of incubation. In contrast, at the highest concentration, these serine proteinases increased the release of prostacyclin from ECs. This effect was inhibited by both non-selective and selective COX-1 and COX-2 inhibitors. Moreover, these toxins did not up-regulated the protein expression of COX-1 and -2. Inhibition of the catalytic activity of PA-BJ and gyroxin or pre-incubation of ECs with PAR-1 antagonist did not abrogate the ability of these toxins to induced PGI₂ release. These findings provide evidence that PA-BJ and gyroxin are able to stimulate production of prostacyclin by ECs by a mechanism dependent on stimulation of COX-1 and COX-2 enzyme activity. Moreover, the enzyme activity of these serine proteinases and the PAR-1 receptor do not contribute for this effect on the endothelium.

Keywords: Serine proteinase; PA-BJ; Gyroxin; Prostacyclin; Cyclooxygenases; Endothelial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo de ativação de receptor PAR-1 por serinoproteínases	03
Figura 2.	Efeito das serinoproteínases PA-BJ e gioxina na viabilidade das células endoteliais em cultura	19
Figura 3.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na viabilidade das células endoteliais em cultura	21
Figura 4.	Efeito da PA-BJ e da gioxina na integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura	23
Figura 5.	Efeito da PA-BJ e da gioxina na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura	25
Figura 6.	Efeitos dos inibidores das ciclooxigenases na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura	27
Figura 7.	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ, em células endoteliais	29
Figura 8.	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela gioxina em células endoteliais	31
Figura 9.	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela trombina, em células endoteliais	33
Figura 10.1.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-1, após 6 horas de incubação	35
Figura 10.2.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-1, após 12 horas de incubação	36
Figura 10.3.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-1, após 24 horas de incubação	37
Figura 11.1.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-2, após 6 horas de incubação	39
Figura 11.2.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-2, após 12 horas de incubação	40
Figura 11.3.	Efeito da PA-BJ e da gioxina, na expressão protéica da	

	ciclooxigenase-2, após 24 horas de incubação	41
Figura 12.	Efeitos do composto SCH 79797, inibidor seletivo de receptores PAR-1, na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura	43
Figura 13.	Efeitos do composto PMSF na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura	45
Figura 14.	Efeito do pré-tratamento com inibidor de receptores PAR-1 na liberação de prostaciclina, induzido pela PA-BJ, gioxina e trombina, em células endoteliais	47
Figura 15.1.	Efeito da inativação da PA-BJ na liberação de PGI₂, em células endoteliais	49
Figura 15.2.	Efeito da inativação da gioxina na liberação de PGI₂, em células endoteliais	50
Figura 15.3.	Efeito da inativação da trombina na liberação de PGI₂, em células endoteliais	51

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
CE	célula endotelial
COX	ciclooxigenase
EIA	ensaio imunoenzimático
E.P.M.	erro padrão da média
PARs	receptores ativados por proteinases
PGI₂	prostaciclina
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
SPVs	serinoproteinases de venenos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações gerais sobre o endotélio	6
1.2	Considerações gerais sobre os prostanóides e ciclooxigenases.....	8
2	OBJETIVOS.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Toxinas.....	12
3.2	Células endoteliais.....	12
3.2.1	Subcultivo das células endoteliais.....	12
3.2.2	Cultura de células endoteliais.....	13
3.3	Ensaio para a determinação da viabilidade celular.....	13
3.3.1	Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH).....	13
3.3.2	Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol (MTT).....	14
3.4	Ensaio para a avaliação da integridade da monocamada de células endoteliais.....	14
3.5	Determinação da concentração de prostaciclina.....	15
3.6	Tratamentos farmacológicos.....	15
3.7	Análise por <i>Western blotting</i>.....	16
3.8	Avaliação da participação da atividade catalítica da PA-BJ e da giroxina na liberação de PGI₂	17
3.9	Análise estatística.....	17
4	RESULTADOS.....	18
4.1	Efeito das serinoproteinases PA-BJ e giroxina na viabilidade das células endoteliais em cultura.....	18
4.2	Efeito da PA-BJ e da giroxina na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura.....	20
4.3	Efeito da PA-BJ e da giroxina na integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura.....	22
4.4	Efeito da PA-BJ e da giroxina na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura.....	24
4.5	Efeitos dos inibidores das ciclooxigenases na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura.....	26

4.6	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ em células endoteliais.....	28
4.7	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela giroxina em células endoteliais.....	30
4.8	Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzido pela trombina, em células endoteliais.....	32
4.9	Efeito da PA-BJ e da giroxina, na expressão protéica da ciclooxigenase-1...	34
4.10	Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-2...	38
4.11	Efeitos do composto SCH 79797, inibidor seletivo de receptores PAR-1, na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura.....	42
4.12	Efeitos do PMSF, inibidor serinoproteinases, na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura.....	44
4.13	Efeito do inibidor de receptor PAR-1 na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ, giroxina e trombina, em células endoteliais.....	46
4.14	Efeito da inativação da PA-BJ, giroxina e trombina na liberação de PGI ₂ , em células endoteliais.....	48
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes têm grande importância na clínica médica e na pesquisa científica, uma vez que os acidentes ofídicos são, ainda, freqüentes e graves, particularmente nas regiões tropicais do mundo (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998).

A fauna ofídica de interesse médico no Brasil está representada por duas famílias: a) Viperidae, à qual pertencem os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* e b) Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil pertencem ao gênero *Bothrops* (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978), enquanto os acidentes causados pelas serpentes do gênero *Crotalus* apresentam o maior índice de letalidade (1,87%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

O quadro fisiopatológico do envenenamento, causado por serpentes do gênero *Bothrops*, é caracterizado por reações locais imediatas e efeitos sistêmicos. As ações locais são caracterizadas por lesões hemorrágicas, necrose do tecido epitelial e muscular e resposta inflamatória marcante (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; TEIXEIRA, *et al.*, 1994). Os efeitos sistêmicos envolvem alterações da coagulação sangüínea e do sistema cardiovascular, que podem levar ao choque hipovolêmico e à insuficiência renal aguda, em casos mais graves (AMARAL *et al.*, 1985; OTERO *et al.*, 2002). Por outro lado, o quadro clínico do envenenamento por serpentes do gênero *Crotalus* caracteriza-se por manifestações sistêmicas, visto que os sintomas locais são pouco expressivos, com pouca ou ausência de dor, edema discreto e, raramente, eritema (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003). Ainda, este veneno apresenta três atividades de importância clínica: neurotóxica, miotóxica e coagulante (ROSENFELD, 1971).

Os venenos de serpente, em particular da família Viperidae, são constituídos por misturas complexas de substâncias de natureza protéica e não protéica, com estruturas e atividades biológicas diversas. Parte das proteínas são enzimas, como as fosfolipases A₂, as metaloproteinases e as serinoproteinases, enquanto outras não possuem atividade enzimática, como as desintegrinas e lectinas do tipo C (BRAUD *et al.*, 2000).

Os distúrbios da coagulação estão entre os efeitos mais graves do envenenamento causado pelas serpentes da família Viperidae (KAMIGUTI *et al.*, 1986; DEMPFLÉ *et al.*, 1990; SANO-MARTINS e SANTORO, 2003). Dentre os componentes desses venenos, as metaloproteinases e serinoproteinases são as principais enzimas envolvidas em eventos

relacionados aos distúrbios na hemostasia, decorrentes do envenenamento (para revisões vide BJARNASON e FOX, 1988/89; SERRANO e MAROUN, 2005).

As serinoproteinases são enzimas proteolíticas que dependem de um resíduo de serina para a sua atividade catalítica (MATHEWS *et al.*, 2000). Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e estão presentes em células procarióticas e eucarióticas (VOET *et al.*, 2002). As serinoproteinases incluem exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e ômega peptidases (BARRETT *et al.*, 1998).

Com base nas estruturas tridimensionais, as várias famílias de serinoproteinases foram agrupadas em sete clãs: SA, SB, SC, SE, SF, SH e TA, que podem ter ancestrais comuns. O sítio catalítico das enzimas do clã SA, ao qual pertencem as serinoproteinases de venenos de serpentes, é formado por três resíduos de aminoácidos: histidina, aspartato e serina. A orientação espacial destes resíduos é bastante conservada entre os membros dessas famílias. A estrutura terciária do clã SA consiste, principalmente, de pregas beta e é composta por dois domínios, entre os quais o sítio catalítico está localizado (BARRETT *et al.*, 1998).

As serinoproteinases de mamíferos, pertencentes a este clã - clã SA - são numerosas e constituem uma grande família. Algumas delas, como a tripsina, têm função digestiva e outras desempenham um papel biológico mais específico, como fatores reguladores que ativam proteoliticamente, zimógenos atuantes na cascata de coagulação sanguínea (DAVIE *et al.*, 1991). As serinoproteinases também atuam na regulação do sistema complemento (ARLAUD *et al.*, 1998) e na função celular, como moléculas sinalizadoras de receptores ativados por proteinases (PARs) (DERY *et al.*, 1998). Apesar da similaridade de suas estruturas tridimensionais, as serinoproteinases pró-coagulantes (trombina, fator Xa, fator IXa e fator VIIa), a anticoagulante (proteína C) e as enzimas fibrinolíticas, diferem quanto à especificidade pelo substrato e suscetibilidade a inibidores (PERONA e CRAIK, 1997).

Como mencionado acima, o mecanismo pelo qual as serinoproteinases regulam a função celular, envolve a ativação de receptores PAR. Estes receptores fazem parte de uma família de receptores acoplados à proteína G, constituídos por sete domínios transmembrana. Tais receptores são ativados por um mecanismo singular, que necessita de proteinases para efetuar uma clivagem proteolítica de sua região N-terminal, no domínio extracelular, expondo um novo N-terminal que liga-se ao receptor, ativando-o, como mostra a figura 1. Até o presente foram identificados quatro subtipos de receptores PAR, denominados de PAR-1 a -4, que exibem distribuição, expressão e seletividade por serinoproteinases tecido-específicas. Os receptores PAR-1, -3 e -4 são alvos para a trombina, tripsina ou catepsina G, enquanto o

PAR-2 é ativado por tripsina, triptase de mastócitos, fator Xa, acrosina, gingipaína e serinoproteinases neuronais (para revisão vide STEINHOFF *et al.*, 2005).

Figura 1. Mecanismo de ativação de receptor PAR-1 por serinoproteinases, modificado a partir de WHEELER-JONES (2008).

As serinoproteinases de venenos (SPVs) pertencem à família S1 do clã SA (HALFON e CRAIK, 1998). Apesar do alto grau de identidade na sequência de aminoácidos, as SPVs diferem entre si quanto à especificidade sobre os substratos. Estas enzimas atuam especificamente em componentes envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária ou causando degradação proteolítica, acarretando desequilíbrio no sistema hemostático das presas (SEEGERS e OUYANG, 1979; MARKLAND, 1997; PIRKLE, 1998). As SPVs não são letais, mas contribuem para este efeito quando associadas a outras proteínas do veneno (MARKLAND, 1997; para revisão vide KINI e EVANS, 1990).

As SPVs apresentam um mecanismo catalítico comum, que inclui um resíduo de serina extremamente reativo, importante para a formação de um complexo transitório acil-enzima, que é estabilizado pela presença dos resíduos de histidina e de aspartato, no interior do sítio ativo (BARRETT e RAWLINGS, 1995). Por isto, as SPVs são sensíveis a reagentes que modificam o resíduo de serina, como o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DFP). A maioria dessas proteinases são glicoproteínas contendo um número variável de sítios N- ou O-glicosilados, em posições sequenciais, que diferem entre as SPVs (ITOH *et al.*, 1987; PARRY *et al.*, 1998).

As atividades das serinoproteinases de venenos variam entre as espécies de serpentes. Algumas possuem atividades fibrinolíticas e fibrinogenolíticas, porém, a maioria delas exhibe apenas esta última. A atividade fibrinogenolítica libera, preferencialmente, o fibrinopeptídeo A ou B ou ambos e promove a formação de coágulos de fibrina. Em mamíferos para exercer

este efeito, a trombina importante na cascata de coagulação, atua sobre fibrinogênio por meio de dois diferentes sítios hidrofóbicos de reconhecimento (STUBBS e BODE, 1993). Assim, por possuírem atividade coagulante, como a trombina, as SPVs são conhecidas como enzimas trombina-símile (STOKER *et al.*, 1982; MARKLAND, 1998; PIRKLE, 1998). Porém, em contraste com a trombina, que é multifuncional, as SPVs apresentam apenas uma das atividades da trombina, ou seja, podem atuar de forma específica pela clivagem do fibrinogênio ou pela ativação do fator V ou pela ativação da proteína C ou como potentes agentes agregantes de plaquetas. Algumas destas enzimas têm sido utilizadas como agentes desfibrinantes, em várias condições clínicas (para revisão vide SERRANO e MAROUN, 2005). Nesse sentido, foi demonstrado que as serinoproteinases de mamíferos, trombina, tripsina, triptase e elastase, são indutores potentes da secreção de interleucina-6 (IL-6) por monócitos e este efeito foi relacionado à ativação de receptores PAR. A estimulação da liberação desta citocina, pelas serinoproteinases, sugere o seu envolvimento em patologias de natureza inflamatória em humanos (LI *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que serinoproteinases ativadoras de PAR-1, PAR-2 e PAR-4 induziram a liberação de prostaglandina E_2 e o relaxamento da musculatura lisa em traquéia murina, concomitantemente (LAN, *et al.*, 2001).

A literatura mostra que além da regulação da hemostasia e trombose, a trombina exerce ações biológicas importantes, que são independentes de sua função trombogênica, como a regulação da resposta inflamatória e a proliferação do músculo liso vascular e de células endoteliais (CEs) (MCNAMARA *et al.*, 1993; HERBERT *et al.*, 1994). A trombina, ao ativar receptores PAR-1 de CEs, induz a secreção do fator de von Willebrand, a síntese de IL-8 e a expressão de moléculas de adesão (WHEELER-JONES *et al.*, 1996; LUDEMAN *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação dos receptores PAR-1 por esta serinoproteinase, em CEs em cultura causou a liberação prolongada de prostaciclina (PGI_2), o principal metabólito do ácido araquidônico (AA), gerado pelo endotélio e aumento da expressão da ciclooxygenase-2 (COX-2), enzima envolvida na produção de eicosanóides (HOULISTON *et al.*, 2002; SYEDA *et al.*, 2006; para revisão vide WHEELER-JONES 2008). Neste contexto, cabe ressaltar que a PGI_2 tem papel relevante na fisiologia vascular, por suas ações vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. Em caso de disfunção, este prostanóide exerce efeitos inflamatórios (para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004).

De outra parte, a literatura apresenta evidências de que os venenos de serpentes da família Viperidae, particularmente do gênero *Bothrops*, causam alterações no epitélio vascular

e afetam parâmetros funcionais e morfológicos de CEs em cultura (OWNBY *et al.*, 1978; OWNBY, 1990; ARAKI *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.*, 1994; BARRAVIERA, 1994).

O veneno da serpente *Bothrops jararaca*, a mais importante da América do Sul, do ponto de vista médico, contém um alto teor de serinoproteinases. Até o presente foram isoladas pelo menos seis serinoproteinases do veneno desta serpente, que são: i) a botrombina, ii) a *Bothrops* proteinase A (BPA), iii) a KN-BJ 1, iv) a KN-BJ 2, v) a TL-BJ e vi) a PA-BJ (NISHIDA *et al.*, 1994; MANDELBAUM e HENRIQUES, 1964; SERRANO *et al.*, 1998; SERRANO *et al.*, 2000; SERRANO *et al.*, 1995). Embora as serinoproteinases do veneno de *B. jararaca* tenham especificidades distintas pelos substratos, elas apresentam uma grande identidade na sequência de aminoácidos, que varia entre 50 a 80%. A tríade catalítica His-Asp-Ser e os resíduos de cisteína, envolvidos em pontes dissulfeto intramoleculares são rigidamente conservados (SAGUCHI *et al.*, 2005).

A PA-BJ, de interesse neste estudo, é uma glicoproteína básica, com ponto isoelétrico acima de 9,0, sem atividade coagulante sobre o fibrinogênio. Esta enzima possui massa molecular estimada em 30 kDa, sendo composta de 232 resíduos de aminoácidos e contém um sítio N- e outro O- glicosilado nos resíduos Asn²⁰ e Ser²³ (SERRANO *et al.*, 1995).

Do ponto de vista das ações biológicas, a PA-BJ tem atividade agregante sobre plasma rico em plaquetas e suspensões de plaquetas lavadas, indicando uma ação que independe de fibrinogênio exógeno, à semelhança da trombina. Ainda, de acordo com Serrano e Maroun (2005), a PA-BJ assemelha-se em muitos aspectos à trombocitina, uma serinoproteinase isolada de *B. atrox* (KIRBY *et al.*, 1979) e à MSP1, uma serinoproteinase isolada de *B. moojeni* (SERRANO *et al.*, 1993). O efeito da PA-BJ em plaquetas depende da integridade do sítio catalítico e é mediado por receptores PAR-1 e PAR-4, que também estão envolvidos, no efeito da trombina, este efeito da ação da PA-BJ em receptores PAR-1 e PAR-4, foi demonstrado por SANTOS *et al.*, (2000) utilizando receptor PAR-1 recombinante e PAR -4 transfectado em fibroblastos. Ainda, esta serinoproteinase induz a mobilização de cálcio em plaquetas e dessensibiliza estas células às ações da trombina e ao peptídeo SFLLRN, agonista de receptores PAR-1 (SANTOS *et al.*, 2000; SAGUCHI *et al.*, 2005). Apesar da afinidade da PA-BJ pelos receptores PAR (SANTOS *et al.*, 2000), que são expressos em vários tipos celulares e estão envolvidos na regulação de diversas funções celulares (para revisão vide STEINHOFF *et al.*, 2005), não existem estudos na literatura relacionados às atividades biológicas desta serinoproteinase, relacionadas à ativação de receptores PAR em outros tipos celulares, que não plaquetas, justificando estudos a este respeito.

No caso do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, até o presente, foram isoladas duas serinoproteinases trombina-símeles; uma delas causa incoagulabilidade sanguínea resultante do consumo de fibrinogênio (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003) e a outra é a giroxina (BARRIO, 1961). Esta última, apresenta massa molecular que varia entre 33 e 35 (SEKI *et al.*, 1980).

Do ponto de vista das ações biológicas, a giroxina é um componente tóxico, não-letal, do veneno crotálico, que age sobre o sistema nervoso central, causando a síndrome da lesão labiríntica em camundongos, caracterizada por movimentos circulatorios do corpo, ao longo do eixo longitudinal. Além disso, esta toxina possui ação coagulante sobre o fibrinogênio em plasma de mamíferos, à semelhança da trombina (SEKI *et al.*, 1980). No entanto, da mesma forma que para a PA-BJ, não há relatos na literatura sobre as ações desta toxina em células endoteliais.

Pelo exposto acima e considerando que a PA-BJ e a giroxina apresentam similaridade de ação pró-coagulante com a trombina, torna-se relevante investigar as ações destas serinoproteinases de veneno sobre o endotélio.

1.1 Considerações gerais sobre o endotélio

O endotélio vascular é constituído por uma camada de células - células endoteliais - que revestem o lúmen dos vasos e separam o sangue dos tecidos. A sua integridade funcional e estrutural é fundamental para a manutenção da homeostasia e da função circulatória (NEREM *et al.*, 1993).

As células endoteliais, de modo geral, são alongadas, poligonais e dotadas de ampla superfície. O núcleo é alongado, acompanhando o maior eixo da célula. Estas células apresentam grande número de vesículas pinocíticas na membrana e no citoplasma, sistema vesículo-canalicular denso e escassez relativa de organelas. O citoesqueleto contém microfilamentos e filamentos intermediários, que parecem ser responsáveis pela contratilidade celular. Observa-se, ainda, a presença de microtúbulos dispostos em feixes, embebidos em matriz amorfa e envoltos por membrana, denominados de grânulos Weibel-Palade. Estes grânulos constituem o sítio de síntese do fator de Von Willebrand, importante para adesão de plaquetas à matriz extracelular e um marcador de células endoteliais. Além disso, as células endoteliais formam complexos juncionais com as células vizinhas. Tais junções desempenham papel importante na regulação da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos. Do ponto de vista funcional, estas interações são classificadas em junções

comunicantes, aderentes e ocludentes. O tipo e número das junções variam ao longo da rede vascular. Desta forma, tais junções são numerosas e bem organizadas em grandes vasos e quase ausentes nas vênulas pós-capilares, local em que o extravasamento plasmático e as trocas de constituintes do plasma e o meio extravascular necessitam ser particularmente eficientes. Esta camada comporta-se como uma barreira que impede a passagem de elementos figurados do sangue, complexos imunes e de várias outras macromoléculas e atua como suporte da CE, contribuindo para a estabilidade estrutural do endotélio e manutenção da luz vascular. Além disso, a interação das CEs com os componentes da membrana basal modula a diferenciação destas células durante a embriogênese e regula a sua polaridade (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1988). A superfície luminal das CEs por sua vez, é superposta por uma lâmina fixa rica em ácido siálico, oligossacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e sulfato de heparan, que parece atuar como sítio de reconhecimento de moléculas para transporte ativo e uma outra superfície, móvel, que contém proteínas plasmáticas, adsorvidas à membrana celular (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1991).

O endotélio, além de sua função como membrana semipermeável, é um tecido metabolicamente ativo, por sua capacidade de sintetizar e secretar inúmeras substâncias exercendo várias funções fisiológicas: a) no metabolismo de substâncias vasoativas, por conter enzimas que transformam angiotensina I (AGI) em angiotensina II (AGII) e inativam a noradrenalina, serotonina e bradicinina; b) na hemostasia, por meio da produção de substâncias coagulantes (fator de von Willebrand; inibidor de plasminogênio) e de substâncias anticoagulantes como a PGI_2 e ativador de plasminogênio, além de conter antitrombina III e trombomodulina, na superfície de membrana e expressar receptores para trombina e fibrinogênio; c) na modulação do tônus vascular, por sua capacidade de produzir e liberar fatores relaxantes da musculatura lisa dos vasos, como o óxido nítrico (NO) e PGI_2 , e fatores de contração do músculo liso, como as endotelinas e AG II e d) como produtor de várias substâncias endógenas com papel fisiológico relevante, como os antígenos dos grupos A e B, fibronectina, proteoglicanos, interleucinas, eicosanóides, colágenos do tipo IV, V e VIII, nidogênio e laminina (MONCADA *et al.*, 1991; CIRINO, 1998; YANAGISAWA *et al.*, 1988, para revisões vide LOESCH, 2005; THUILLEZ e RICHARD, 2005). Por outro lado, as células endoteliais sofrem alterações de estrutura, função e propriedades metabólicas, em resposta a fatores de crescimento, substâncias vasoativas e citocinas, que variam de acordo com o órgão em que se localizam (VANE *et al.*, 1987). Dessa forma, o endotélio ativado afeta o crescimento do músculo liso, por sua capacidade de gerar diversos fatores de crescimento, que induzem espessamento da parede

dos vasos e favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (THUILLEZ e RICHARD, 2005). Ainda, a literatura mostra que o tipo e o estado de interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular determinam diferentes programas genéticos nessas células, como a diferenciação, crescimento e a apoptose (HUANG e INGBER, 2000).

As células endoteliais desempenham papel central em processos fisiopatológicos, como a inflamação, em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios, tais células expressam moléculas de adesão E e P-selectinas, ICAM-1 e VCAM (ZIMMERMAN et al., 1992; NEWMAN, 1996), que favorecem a migração de leucócitos para o espaço subendotelial. Além disso, essas células são capazes de liberar diversos mediadores inflamatórios, que iniciam e/ou amplificam o processo (KADL e LEITINGER, 2005; POBER e SESSA, 2007). Ainda, entre os receptores que são expressos pelas CEs, estão os quatro subtipos de receptores PARs (para revisão vide WHEELER-JONES, 2008).

Pelo exposto, verifica-se que o endotélio é um tecido metabolicamente ativo e as alterações causadas no mesmo podem ter repercussões importantes no sistema vascular. Além disso, as CEs, por sua localização estratégica, devem constituir um alvo importante para as ações de venenos e toxinas. Desse modo, o estudo das ações das serinoproteinases desses venenos, PA-BJ e giroxina, revestem-se de importância.

1.2 Considerações gerais sobre os prostanóides e ciclooxigenases

Em membranas celulares de mamíferos, o AA representa mais de 90% dos ácidos graxos insaturados. O AA produto da hidrólise de fosfolipídios de membranas celulares, por fosfolipases A₂, é metabolizado por vários complexos enzimáticos, como as ciclooxigenases (COXs) e as lipoxigenases (ROCCA e FITZGERALD, 2002).

Atualmente, são descritas três isoformas de ciclooxigenases, denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2) e ciclooxigenase-3 (COX-3). As duas primeiras isoformas são as mais amplamente estudadas, enquanto a terceira foi recentemente descoberta (WARNER e MITCHELL, 2004). Alguns autores sugerem, ainda, a existência de uma quarta isoforma de ciclooxigenase, que poderia ser induzida pelo diclofenaco, cuja função estaria relacionada à fase de resolução do processo inflamatório. No entanto, a existência de COX-4 ainda é alvo de especulações (BOTTING e AYOB, 2005).

A COX-1 é a isoforma expressa constitutivamente na maioria das células e tecidos, que incluem o endotélio. Esta enzima leva à formação dos prostanóides que, em condições

fisiológicas, são responsáveis pela regulação da homeostasia (O'NEILL e FURD-HUTCHINSON, 1993). A COX-2, por sua vez, pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida em vários tecidos e células presentes em processos inflamatórios agudos e proliferativos, que ocorrem na artrite reumatóide, úlcera gástrica, câncer do cólon, hiperalgesia, doença de Alzheimer e durante a angiogênese (para revisão vide KATORI e MAJIMA, 2000; SIMMONS, *et al.*, 2004). A indução da COX-2 decorre da ação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), as interleucinas IL-1 e IL-2 e do lipopolissacarídeo de bactérias (LPS). A diminuição da indução dessa isoforma, por outro lado, é causada por citocinas antiinflamatórias, tais como as IL-4, IL-10 e IL-13, além dos glicocorticóides (SCOTT *et al.*, 1999).

As COXs apresentam duas atividades distintas: uma atividade endoperoxído sintase que oxigena e cicliza o AA, para formar o endoperoxído PGG/ PGG₂, e uma atividade peroxidase, que reduz o grupo 15-hidroperoxi deste metabólito, para formar a PGH₂. Estas são quimicamente instáveis e sofrem a ação de sintases específicas, originando uma variedade de prostanóides (SMITH *et al.*, 2000; ROCA e FITZGERALD, 2002).

As prostaglandinas são mediadores importantes na regulação de vários sistemas fisiológicos, como o sistema cardiovascular, gastrointestinal e renal (para revisão vide HARRIS *et al.*, 2002). Em níveis alterados, estes mediadores participam de diversos processos fisiopatológicos, que incluem a inflamação (VANE *et al.*, 1990; para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004). A PGI₂, de interesse neste estudo, é sintetizada, principalmente, pelas CEs e exerce um importante papel fisiológico, por suas ações vasodilatadora e inibitória da agregação plaquetária. Este prostanóide é fundamental na regulação das propriedades adesivas do endotélio. Em condições fisiopatológicas, este mediador contribui para processos inflamatórios, por exercer ação vasodilatadora, potenciar o aumento de permeabilidade vascular causado por outros mediadores e induzir hiperalgesia (VANE *et al.*, 1990; VANE e BOTTING, 1995; e para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004).

Até o presente, foram descritos dois tipos de receptores para a prostaciclina: i) o receptor IP, de superfície celular e ii) o receptor PPAR (*peroxisome proliferator- activated receptor*). Os receptores IP são acoplados à proteína G, possuem sete domínios transmembrana e estão distribuídos em diversos tecidos. O receptor PPAR é um fator de transcrição, que pertence à superfamília de receptores nucleares. Quando ativado, tem a capacidade de modular a expressão de genes, por meio da ligação a elementos responsáveis (PPRE), localizados na região promotora dos genes que estão sob seu comando transcricional. Esta ligação depende da associação do PPAR a outro fator protéico, o ácido 9-*cis* retinóico

(RXR). Estudos recentes indicam que agonistas do PPAR estão envolvidos na resolução do processo inflamatório, via controle negativo do fator de transcrição NF- κ B, antagonizando este fator, responsável pela ativação da expressão de genes pró-inflamatórios. Dentre os genes pró-inflamatórios, regulados negativamente pelo PPAR, está o SR-A, que codifica a proteína de superfície celular, associada a eventos de adesão celular e à enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ISSEMAN e GREEN, 1990; GEARING *et al.*, 1993; KLIEWER *et al.*, 1992; FRUCHART *et al.*, 1999, MORAES *et al.*, 2005).

Devido a estas ações, a PGI₂ foi implicada na patogenia de doenças vasculares periféricas (para revisão vide VANE e CORIN, 2003). Além disso, estudos *in vitro* indicaram que este prostanóide exerce ação protetora em CEs, impedindo apoptose induzida por agentes oxidantes (LIOU *et al.*, 2007).

Em contrapartida, a deficiência de PGI₂ tem implicações na patogênese de doenças vasculares periféricas, e desta forma, o desenvolvimento de análogos deste prostanóide poderia permitir um tratamento mais eficaz para essas patologias. Ainda, há relatos na literatura sobre os efeitos benéficos da infusão de prostaciclina em pacientes com doenças vasculares (GRYGLEWSKI *et al.*, 1979). Após a síntese e liberação, a PGI₂ é rapidamente convertida, por processos não-enzimáticos, em um metabólito inativo, a 6-ceto prostaglandina F₁ α (PGF₁ α). Por esse motivo, a aplicação deste potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária na terapêutica tem seu uso restrito pela instabilidade química de sua molécula.

Atualmente, a pesquisa clínica, voltada para a terapêutica de doenças vasculares periféricas, como a doença de Raynaud, o vaso espasmo ou a isquemia severa, dedica-se ao desenvolvimento de análogos estáveis da PGI₂ e à busca de indutores da produção da prostaciclina (MITCHELL *et al.*, 2007).

Desse modo, investigar as ações de toxinas de venenos sobre a produção desse mediador, pelo endotélio, reveste-se de importância.

2 OBJETIVOS

Este estudo visa avaliar e caracterizar as atividades das serinoproteinases PA-BJ e giroxina, em células endoteliais murinas, em cultura, quanto à:

- a) viabilidade das células endoteliais;
- b) integridade das monocamadas;
- c) liberação de prostaciclina;
- d) participação das COX-1 e -2 na produção de prostaciclina induzida pelas serinoproteinases;
- e) expressão protéica de COX-1 e COX-2 e
- f) participação do receptor PAR-1 na produção de prostaciclina induzida pelas serinoproteinases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Toxinas

Foram utilizadas as serinoproteinases, PA-BJ, do veneno da serpente *Bothrops jararaca* e a giroxina, do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. A PA-BJ foi isolada e purificada de acordo com Serrano *et al.*, (1995). Após a purificação, esta toxina foi liofilizada e mantida a -20 °C até o momento da sua utilização. Esta toxina foi fornecida pela Dra. Solange Toledo Serrano, do Laboratório Especial de Toxinologia, do Instituto Butantan, São Paulo.

A giroxina foi isolada e purificada de acordo com Barrio (1961). Após a purificação, a toxina foi liofilizada e mantida a -20 °C até o momento da sua utilização. Esta toxina foi fornecida pelo Dr. Andreimar Martins Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

3.2 Células endoteliais

Foram utilizadas CEs murinas (hibridoma) da linhagem tEnd (*thymus endothelium*), gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica.

3.2.1 Subcultivo das células endoteliais

As CEs foram cultivadas em frascos de poliestireno de 25 cm² (COSTAR), contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (RPMI) (SIGMA - ALDRICH), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (CULTILAB), gentamicina (40 µg/mL) (SCHERING – PLOUGH) e L-glutamina (2 mM) (AMRESCO), mantidas em incubadora, sob atmosfera a 5% de CO₂, a 37 °C. Após atingirem confluência, as CEs foram, subcultivadas. Para tanto, o meio de cultura RPMI foi aspirado com uma pipeta Pasteur e as CEs foram lavadas com 2 mL de uma solução salina balanceada (EBSS). Em seguida, 2 mL de uma solução de tripsina 0,05% (GIBCO BRL)/EDTA 0,02% (SIGMA – ALDRICH) foram adicionados ao frasco, que retornou à estufa de cultura, com atmosfera controlada (5% CO₂/37 °C), por um período de até 5 minutos. Decorrido esse período, as CEs foram observadas ao microscópio de luz invertida (CARL ZEISS), para a verificação do destacamento das mesmas. Feito isso, as CEs,

tripsinizadas e homogeneizadas, foram colocadas em um tubo cônico de 50 mL (COSTAR) e centrifugadas a 200 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as CEs ressuspensas em meio de cultura RPMI/SFB, previamente ambientalizado na estufa de cultura.

3.2.2 Cultura de células endoteliais

A partir do subcultivo de CEs, 1×10^4 células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços (COSTAR) e colocadas em incubadora com atmosfera controlada (5% $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$), por 48 horas. Para tanto, as células foram destacadas dos frascos, com uma solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% e processadas conforme item 3.2.1. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as CEs ressuspensas em meio de cultura RPMI/SFB, em um volume fixo (1 mL). Feito isso, uma alíquota de 10 μL da suspensão foi diluída em 90 μL de azul de Tripán (0,1%) (SIGMA – ALDRICH), para a contagem do número total de células, em microscópio de luz e determinação da viabilidade celular, pela técnica de exclusão. A partir desses parâmetros, foram feitas diluições apropriadas para a aplicação das CEs nas microplacas e cultivo celular.

3.3 Ensaio para a determinação da viabilidade celular

3.3.1 Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade enzimática da LDH, presente no meio de cultura, foi tomada como parâmetro da viabilidade celular. Para tanto, 1×10^4 células/poço foram semeadas em microplacas de 96 poços e colocadas em incubadora com atmosfera controlada (5% $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$), por 48 horas. Após a confluência, as CEs foram incubadas com PA-BJ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 μM ou giroxina 1 μM ou trombina 1 U/mL ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo) (SIGMA – ALDRICH), diluídos em meio de cultura RPMI ou meio de cultura RPMI somente (controle negativo), por 3 e 24 horas. Após este período de tempo, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 200 g, por 10 minutos. A seguir, 30 μL do sobrenadante foram adicionados à outra microplaca de cultura de 96 poços, acompanhados da adição de 170 μL do substrato, em tampão fosfato, contendo: NaCl 200 mM (SIGMA – ALDRICH), NADH 0,2 mM (SIGMA – ALDRICH), piruvato 1,6 mM/poço (SIGMA – ALDRICH). A seguir, efetuou-se a leitura da densidade óptica (D.O.), a 340 nm, no intervalo de tempo de 0 e 10 minutos. Os resultados foram extrapolados pelo decréscimo da D.O.,

resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero e expressos em mmoles de NAD/minuto.

3.3.2 Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol (MTT)

A atividade metabólica mitocondrial das células endoteliais foi avaliada pelo método da redução do MTT. Após cada período de incubação (3 ou 24 horas) com a PA-BJ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M ou giroxina 1 μ M ou trombina 1 U/mL ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo) ou meio de cultura RPMI somente (controle negativo), as células foram centrifugadas a 200 g, por 10 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, em cada poço, 90 μ L de meio RPMI e 10 μ L de MTT (UBS CORPORATION) em solução a 5mg/mL, tamponada. Em seguida, as CE foram incubadas a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 horas. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do MTT, pelas células viáveis, foram adicionados 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) (AMRESCO), por 30 minutos. Após este período, a D.O. foi determinada a 540 nm, em espectrofômetro. A viabilidade foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à ação dos agentes, em relação à monocamada controle negativo.

3.4 Ensaio para a avaliação da integridade da monocamada de células endoteliais

Uma vez formada a monocamada confluenta de CEs, em microplacas de 96 poços, foram realizadas incubações com a PA-BJ, nas concentrações de 0,5 e 1 μ M ou giroxina 1 μ M ou trombina 1 U/mL ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo) ou meio de cultura RPMI apenas (controle negativo), por 3 e 24 horas. Após cada período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram retirados e as monocamadas lavadas com meio de cultura RPMI. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de meio de cultura aos poços e, logo após, acrescentados 10 μ L de uma solução de cristal violeta (0,5%) (BIO-RAD) em ácido acético (30%) (SYNTH). Decorridos 10 minutos, a microplaca foi lavada e colocada para secar. Após a secagem, foram adicionados 100 μ L de metanol absoluto (MERCK) em cada poço, por 10 minutos e, então, foi realizada a leitura da D.O., em espectrofotômetro, a 620 nm. A injúria causada foi definida como a diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à

ação da PA-BJ ou giroxina ou trombina ou TRITON X-100, em relação a monocamadas de CEs não estimuladas (controles negativos).

3.5 Determinação da concentração de prostaciclina

A produção de PGI_2 foi determinada por meio da medida do seu metabólito estável 6-ceto prostaglandia $\text{F}_{1\alpha}$, por ensaio imunoenzimático, utilizando kit disponível comercialmente (Cayman, Co, USA).

As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com a PA-BJ, nas concentrações de 0,5 e 1 μM ou giroxina 1 μM ou trombina 1 U/mL ou meio de cultura RPMI apenas (controle negativo), pelo período de 3 e 24 horas, em incubadora, a 5% de CO_2 , a 37 °C. Após esse período de incubação, as CEs foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos e, então, os sobrenadantes foram retirados. Alíquotas, contendo 50 μL de cada amostra, foram adicionadas às microplacas de 96 poços e incubadas com igual volume do prostanóide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho, por 18 horas. Após este período, a placa foi lavada, com tampão de lavagem e, então, foi adicionado substrato para a acetilcolinesterase, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405 nm e as concentrações foram estimadas a partir de curva padrão específica, em concentrações da PGI_2 representadas em pg/mL.

3.6 Tratamentos farmacológicos

Para esse estudo as monocamadas de CEs, foram pré-incubadas, por 1 hora, com os seguintes fármacos: a) indometacina 10 μM (MERCK SHARP DOHME), b) valeril salicilato 250 μM (SIGMA – ALDRICH), c) etoricoxibe 10 μM (MERCK SHARP DOHME), d) TrisHCl 0,01% (UBS CORPORATION), e) DMSO 0,16%, f) SCH 79797 166 nM (TOCRIS). Após este período a PA-BJ 1 μM ou giroxina 1 μM ou trombina 1 U/mL ou RPMI, foram adicionados às monocamadas de CEs por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO_2 . A citotoxicidade dos fármacos e solventes foi avaliada pela atividade oxidativa mitocondrial das células endoteliais pelo método da redução do MTT, conforme item 3.3.2. A concentração de PGI_2 liberada foi medida conforme descrito no item 3.5.

3.7 Análise por Western blotting

Após a confluência (48 h), as CEs foram incubadas com PA-BJ 1 μ M ou giroxina 1 μ M ou trombina 1 U/mL, diluídos em meio de cultura RPMI ou meio de cultura RPMI somente (controle negativo), por 6, 12 e 24 horas. Após este período de tempo, as placas de cultivo celular foram centrifugadas a 200 g, por 10 minutos. Os precipitados celulares obtidos foram lisados com 50 μ L de tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) (SDS 20%; glicerina; β -mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; azul de bromofenol a 0,1%) e aquecidas a 100°C, por 10 minutos.

As proteínas, contidas em alíquotas de 14 μ L de amostra, aproximadamente 0,12 mg/mL, foram separadas por eletroforese, em gel de poliacrilamida, a 10% (SDS-PAGE). Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, UK), com uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4 °C. Os sítios inespecíficos, da membrana de nitrocelulose, foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5% em tampão de lavagem (Tween-20 10%, pH 7,4), durante 1 hora. A seguir, para a detecção de COX-1 e COX-2, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (anti-IgG de coelho) (Cayman Co., USA) ou anti-COX-2 (anti-IgG de camundongo) (Cayman Co., USA) (diluição 1:1000 v/v e 1:1500 v/v, respectivamente), durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado à peroxidase, para a detecção das COX-1 e -2 (anti-IgG de camundongo, 1:1500 v/v e anti-IgG de coelho, 1:1500 v/v) (GE Healthcare, UK), durante 1 hora. Para o controle do *western blotting*, as membranas foram incubadas também com anticorpo monoclonal anti- β -actina (anti-IgG de camundongo) (Sigma Aldrich Company, USA), na diluição de 1:1000 v/v e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (GE Healthcare, UK) na diluição de 1:1500 v/v.

As bandas imunorreativas para as isoformas da COX-1 e COX-2 foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (GE Healthcare, UK) e, em seguida, reveladas em filme (GE Healthcare, UK), em câmara escura. As densidades das bandas foram determinadas pelo densitômetro GS 800 (Bio Rad Laboratories, USA), utilizando o programa de análise *Molecular Analyst*[®] (Bio Rad Laboratories, USA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de β -actina.

3.8 Avaliação da participação da atividade catalítica da PA-BJ e da giroxina na liberação de PGI₂

Alíquotas de PA-BJ, giroxina ou trombina, foram inativadas com uma solução de PMSF 2 mM (SIGMA – ALDRICH), por 1 hora a 37 °C. Como controle, outras alíquotas destas mesmas serinoproteinases foram incubadas com etanol a 1%, o solvente do PMSF, pelo mesmo período. Após este período, as monocamadas de CEs foram incubadas com PA-BJ 1 µM ou giroxina 1 µM ou trombina 1 U/mL ou PA-BJ 1 µM (inativa), ou giroxina 1 µM (inativa), ou trombina 1 U/mL (inativa), ou PA-BJ 1 µM (com etanol), ou giroxina 1 µM (com etanol), ou trombina 1 U/mL (com etanol) ou PMSF 0,2 mM ou etanol 0,1% ou RPMI, controle negativo, por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. A citotoxicidade do PMSF e do etanol foi avaliada pela atividade oxidativa mitocondrial das células endoteliais pelo método da redução do MTT, conforme item 3.3.2. A concentração de PGI₂ liberada foi medida conforme descrito no item 3.5.

3.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, nas comparações múltiplas. Foram considerados significantes os valores de $p \leq 0,05$. Para a análise estatística dos resultados expressos em porcentagem, os mesmos foram submetidos a uma transformação através da equação: $y = \arcsin \sqrt{p}$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito das serinoproteinases PA-BJ e giroxina na viabilidade das células endoteliais em cultura

Para este estudo, monocamadas de CEs foram incubadas com concentrações crescentes de PA-BJ ou giroxina ou trombina ou TRITON X-100 (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 3 ou 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pela atividade da LDH, nos sobrenadantes das células, que foi medida pela taxa de oxidação do NADH, na presença do piruvato.

A Figura 2 mostra que a adição de PA-BJ ou giroxina ou trombina às monocamadas de células endoteliais, não alterou a viabilidade celular, em relação ao controle negativo. Por outro lado, a adição de TRITON X-100 às monocamadas de células endoteliais, aumentou, de modo significativo, a liberação da LDH, em relação ao controle negativo, nos períodos de tempo avaliados.

Figura 2. Efeito das serinoproteínases PA-BJ e gioxina na viabilidade das células endoteliais em cultura.

As monocamadas de CEs foram incubadas com: (A) a PA-BJ (0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M) ou (B) a gioxina (1 μ M) ou (C) a trombina (1 U/mL) ou TRITON X-100 (Triton) (0,1%) (controle positivo) ou RPMI apenas (controle negativo), por 3 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da atividade da LDH, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados em mmoles de NAD/min. e representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (ANOVA).

4.2 Efeito da PA-BJ e da gioxina na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura

Para este estudo, monocamadas de CEs, foram incubadas com concentrações crescentes de PA-BJ ou gioxina ou trombina ou TRITON X-100 (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 3 ou 24 horas e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 3 mostra que a adição de PA-BJ ou gioxina ou trombina, às monocamadas de CEs, não alterou a viabilidade celular em relação ao controle negativo. Por outro lado, a adição de TRITON X-100 às monocamadas de CEs, reduziu, significativamente, a atividade metabólica mitocondrial, em relação ao controle negativo, nos períodos de tempo avaliados.

Figura 3. Efeito da PA-BJ e da gioxina na viabilidade das células endoteliais em cultura. As monocamadas de CEs foram incubadas com: (A) a PA-BJ (0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M) ou (B) a gioxina (1 μ M) ou (C) a trombina (1 U/mL) ou TRITON X-100 (Triton) (0,1%) (controle positivo) ou RPMI apenas (controle negativo), por 3 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi determinada pela redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade metabólica celular. Os valores do controle negativo foram tomados como 100% de atividade metabólica celular. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (RPMI) (ANOVA).

4.3 Efeito da PA-BJ e da gioxina na integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas com concentrações crescentes de PA-BJ ou gioxina ou trombina ou TRITON X-100 (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 3 ou 24 horas e a integridade das monocamadas foi avaliada pela medida do descolamento celular a partir do suporte de adesão.

A Figura 4 demonstra que adição de PA-BJ ou da gioxina ou da trombina, às monocamadas de CEs, nas concentrações avaliadas, não alterou a integridade das monocamadas, em relação ao controle negativo. Por outro lado, a adição do TRITON X-100 causou o descolamento das células, do substrato de adesão, que foi significativo em relação ao controle negativo, nos períodos de tempo avaliados.

Figura 4. Efeito da PA-BJ e da gioxina na integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura. As monocamadas de CE foram incubadas com: (A) a PA-BJ (0,5 e 1 μ M) ou (B) a gioxina (1 μ M) ou (C) a trombina (1 U/mL) ou TRITON X-100 (Triton) (0,1%) (controle positivo) ou RPMI apenas (controle negativo), por 3 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A integridade foi avaliada pela determinação do cristal violeta retido nas células não descoladas, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como a diminuição da D.O. em relação àquela da monocamada controle. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (ANOVA).

4.4 Efeito da PA-BJ e da giroxina na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ ou giroxina ou trombina (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 3 ou 24 horas e a liberação de PGI_2 foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$.

A Figura 5 mostra que a adição de PA-BJ, nas concentrações utilizadas, ou giroxina ou trombina, às monocamadas de CEs, não afetou a liberação basal de 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$, na 3ª hora. Por outro lado, na 24ª hora de incubação, a PA-BJ e a giroxina, na concentração de 1 μM , bem como a trombina (1 U/mL), aumentaram, de modo significativo, a liberação de 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$, em relação aos controles negativos.

Figura 5. Efeito da PA-BJ e da giroxina na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura. As monocamadas de CE foram incubadas com: (A) a PA-BJ (0,5 e 1 μM) ou (B) a giroxina (1 μM) ou (C) a trombina (1 U/mL) (controle positivo) ou RPMI apenas (controle negativo), por 3 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO_2 . A concentração de 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ foi determinada nos sobrenadantes por EIA, como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ e representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.5 Efeito dos inibidores das ciclooxigenases na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura

Para este estudo, monocamadas de CEs foram incubadas com valeril salicilato (100, 250 ou 500 μM) ou DMSO 0,26 %, solvente do valeril salicilato, na maior concentração, ou etoricoxibe 10 μM ou DMSO 0,16 %, solvente do etoricoxibe, ou indometacina 10 μM ou TriHCl 0,01%, solvente da indometacina, ou TRITON X-100 (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 6 mostra que a adição de valeril salicilato 500 μM ou TRITON X-100 às monocamadas de CEs, reduziu significativamente a atividade metabólica mitocondrial, em relação ao controle negativo, no período avaliado. Por outro lado, os outros inibidores e o valeril salicilato, em concentrações iguais ou menores que 250 μM , bem como os seus solventes não afetaram a atividade mitocondrial das CEs, de modo significativo, em relação ao RPMI (controle negativo).

Figura 6. Efeitos dos inibidores das ciclooxigenases na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura. As monocamadas de CEs foram incubadas com valeril salicilato (100, 250 ou 500 μM) ou DMSO 0,26 % ou etoricoxibe 10 μM ou DMSO 0,16 %, ou indometacina 10 μM ou TriHCl 0,01%, ou TRITON X-100 (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, a 37 °C e 5% de CO_2 . A atividade metabólica foi determinada pela redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade metabólica celular. Os valores do controle negativo foram tomados como 100% de atividade metabólica celular. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (RPMI) (ANOVA).

4.6 Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina induzida pela PA-BJ em células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas, por 1 hora, com concentrações subcitotóxicas de indometacina, inibidor não seletivo da COX-1 e -2, ou valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1, ou etoricoxibe, inibidor seletivo da COX-2, ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl, solvente da indometacina, ou DMSO, solvente do valeril salicilato e do etoricoxibe, antes da adição da PA-BJ. Após 24 horas desta adição, a liberação de PGI_2 foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$.

Como demonstra a Figura 7, o pré-tratamento das CEs com a indometacina ou valeril salicilato ou, ainda, com o etoricoxibe, reduziu significativamente a liberação de PGI_2 induzida pela PA-BJ, em relação aos respectivos controles, incubados com os veículos e estimuladas com a PA-BJ. O pré-tratamento com o DMSO 0,16% reduziu, de modo significativo, o efeito da PA-BJ.

Figura 7. Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ, em células endoteliais. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas, por 1 hora, com indometacina (10 μ M) ou valeril salicilato (250 μ M) ou etoricoxibe (10 μ M) ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl (0,01%) ou DMSO (0,16%), antes da adição da PA-BJ (1 μ M), e mantidas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. # $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI, * $p \leq 0,05$ em relação à PA-BJ, + $p \leq 0,05$ em relação à PA-BJ + TrisHCl e ‡ $p \leq 0,05$ em relação à PA-BJ + DMSO (ANOVA).

4.7 Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina induzida pela giroxina em células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas, por 1 hora, com concentrações subcitotóxicas de indometacina, inibidor não seletivo da COX-1 e -2, ou valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1, ou etoricoxibe, inibidor seletivo da COX-2, ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl, solvente da indometacina, ou DMSO, solvente do valeril salicilato e do etoricoxibe, antes da adição da giroxina. Após 24 horas desta adição, a liberação de PGI_2 foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$. Como demonstra a Figura 8, o pré-tratamento das CEs com a indometacina ou o valerilsalicilato ou, ainda, com o etoricoxibe, reduziu significativamente a liberação de PGI_2 induzida pela giroxina, em relação aos respectivos controles, incubados com os veículos e a giroxina. O efeito do valeril salicilato foi menor que o efeito da indometacina.

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina, induzida pela gioxina em células endoteliais. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas, por 1 hora, com indometacina (10 μ M) ou valeril salicilato (250 μ M) ou etoricoxibe (10 μ M) ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl (0,01%) ou DMSO (0,16%), antes da adição da gioxina (1 μ M), e mantidas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. # $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI, * $p \leq 0,05$ em relação à gioxina, + $p \leq 0,05$ em relação à gioxina + TrisHCl e ‡ $p \leq 0,05$ em relação à gioxina + DMSO (ANOVA).

4.8 Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina induzida pela trombina, em células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas, por 1 hora, com concentrações subcitotóxicas de indometacina, inibidor não seletivo da COX-1 e -2, ou valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1, ou etoricoxibe, inibidor seletivo da COX-2, ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl, solvente da indometacina, ou DMSO, solvente do valeril salicilato e do etoricoxibe, antes da adição da trombina. Após 24 horas desta adição, a liberação de PGI_2 foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$. Como demonstra a Figura 9, o pré-tratamento das CEs com a indometacina ou o valeril salicilato ou, ainda, com o etoricoxibe, reduziu significativamente a liberação de PGI_2 induzida pela trombina, em relação aos respectivos controles, incubados com os veículos e a trombina. O efeito do valeril salicilato foi menor que o efeito inibitório da indometacina e do etoricoxibe.

Figura 9. Efeito do pré-tratamento com inibidores das ciclooxygenases na liberação de prostaciclina, induzida pela trombina, em células endoteliais. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas, por 1 hora, com indometacina (10 μ M) ou valeril salicilato (250 μ M) ou etoricoxibe (10 μ M) ou RPMI (controle negativo) ou TrisHCl (0,01%) ou DMSO (0,16%), antes da adição da trombina (1 U/mL), e mantidas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. # $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI, * $p \leq 0,05$ em relação à trombina, + $p \leq 0,05$ em relação à trombina + TrisHCl e ‡ $p \leq 0,05$ em relação à trombina + DMSO (ANOVA).

4.9 Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-1 pelas células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ ou giroxina ou trombina ou RPMI (controle) e a expressão da COX-1 foi analisada após 6, 12 e 24 horas de incubação. A Figura 10.1 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-1 e β -actina e a Figura 10.1 (B) mostra a quantificação densitométrica das bandas imunorreativas para a COX-1 após 6 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ, a giroxina e a trombina, não afetaram a expressão basal da COX-1, em relação ao RPMI. A Figura 10.2 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-1 e β -actina e a Figura 10.2 (B) mostra a quantificação densitométrica das bandas imunorreativas para a COX-1, após 12 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ e a giroxina não afetaram a expressão basal da COX-1, em relação ao RPMI. Por outro lado, a trombina induziu um aumento da expressão desta isoforma. A Figura 10.3 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-1 e β -actina e a Figura 10.3 (B) mostra a quantificação densitométrica das bandas imunorreativas para a COX-1, após 24 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ e a giroxina, não afetaram a expressão basal da COX-1, em relação ao RPMI. Por outro lado, a trombina induziu um aumento da expressão desta isoforma.

Figura 10.1. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-1 após 6 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos.

Figura 10.2. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxygenase-1 após 12 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 12 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

Figura 10.3. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-1 após 24 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 12 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.10 Efeito da PA-BJ e da gioxina na expressão protéica da ciclooxigenase-2 pelas células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ ou gioxina ou trombina ou RPMI (controle) e a expressão da COX-2 foi analisada após 6, 12 e 24 horas de incubação. A Figura 11.1 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-2 e β -actina e a Figura 11.1 (B) mostra a quantificação densitométrica das bandas imunorreativas para a COX-2, após 6 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ ou a gioxina não afetaram a expressão basal da COX-2, em relação ao RPMI. Por outro lado, a trombina induziu um aumento da expressão desta isoforma. A Figura 11.2 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-2 e β -actina e a Figura 11.2 (B) mostra a quantificação densitométrica das bandas imunorreativas para a COX-2, após 12 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ ou a gioxina não afetaram a expressão basal da COX-2, em relação ao RPMI, enquanto, a trombina induziu um aumento da expressão desta isoforma. A Figura 11.3 (A) mostra as bandas imunorreativas representativas da COX-2 e β -actina e a Figura 11.3 (B) mostra a quantificação densitométrica dessas bandas, após 24 horas de incubação. Os resultados obtidos neste período demonstraram que a PA-BJ ou a gioxina não afetaram a expressão basal da COX-2, em relação ao RPMI. Por outro lado, a trombina induziu um aumento da expressão desta isoforma.

Figura 11.1. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxygenase-2 após 6 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:1500) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

Figura 11.2. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-2 após 12 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 12 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:1500) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

Figura 11.3. Efeito da PA-BJ e da giroxina na expressão protéica da ciclooxigenase-2 após 24 horas de incubação. As monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ (1 μ M) ou giroxina (1 μ M) ou trombina (1 U/mL) ou RPMI, por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período as células foram lisadas e submetidas ao *western blotting*. **(A):** *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:1500) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1000), representativo de amostras de CEs em cultura (n=3). **(B):** Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.11 Efeitos do composto SCH 79797, inibidor seletivo de receptores PAR-1, na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura

Para o estudo da citotoxicidade do composto SCH 79797, monocamadas de CEs foram incubadas com este composto (0,5, 1, 30, 70 ou 166 nM) ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 12 mostra que a adição do TRITON X-100 às monocamadas de CEs reduziu significativamente a atividade metabólica mitocondrial, em relação ao controle negativo, no período avaliado. Por outro lado, o composto SCH 79797, em todas as concentrações avaliadas, não afetou a atividade mitocondrial das CEs de modo significativo, em relação ao RPMI (controle negativo).

Figura 12. Efeitos do composto SCH 79797, inibidor seletivo de receptores PAR-1, na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura. As monocamadas de CEs foram incubadas com SCH 79797 (0,5, 1, 30, 70 ou 166 nM) ou TRITON X-100 0,1% (Triton) (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi determinada pela redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade metabólica celular. Os valores do controle negativo foram tomados como 100% de atividade metabólica celular. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (RPMI) (ANOVA).

4.12 Efeitos do PMSF na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura

Para o estudo da citotoxicidade do composto PMSF, inibidor da atividade catalítica de serinoproteinases, monocamadas de CEs foram incubadas com este composto (0,1 e 0,2 mM) ou etanol (0,05 e 0,1 %), solvente do PMSF, ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 13 mostra que a adição de TRITON X-100 às monocamadas de CEs, reduziu significativamente a atividade metabólica mitocondrial, em relação ao controle negativo, no período avaliado. Por outro lado, o PMSF e o etanol, em todas as concentrações avaliadas, não afetaram a atividade mitocondrial das CEs, de modo significativo, em relação ao RPMI (controle negativo).

Figura 13. Efeitos do composto PMSF na atividade metabólica mitocondrial de células endoteliais em cultura. As monocamadas de CEs foram incubadas com PMSF (0,1 e 0,2 mM) ou etanol (0,05 e 0,1 %), ou TRITON X-100 0,1% (Triton) (controle positivo) ou RPMI (controle negativo), por 25 horas a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi determinada pela redução do MTT, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade metabólica celular. Os valores do controle negativo foram tomados como 100% de atividade metabólica celular. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (RPMI) (ANOVA).

4.13 Efeito do pré-tratamento com inibidor de receptor PAR-1 na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ, giroxina e trombina, em células endoteliais

Para este estudo, as monocamadas de CEs foram incubadas com o composto SCH 79797 166 nM, inibidor seletivo de receptor PAR-1, ou com RPMI apenas (controle), por 1 hora, antes da adição da PA-BJ 1 μ M, giroxina 1 μ M ou trombina 1 U/mL. Após 24 horas dessa adição, a liberação de PGI₂ foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina F_{1 α} .

Como demonstra a Figura 14, o pré-tratamento das CEs com o SCH 79797 não alterou a liberação de PGI₂ induzida pelas serinoproteinases, em relação aos respectivos controles.

Figura 14. Efeito do pré-tratamento com inibidor de receptor PAR-1 na liberação de prostaciclina, induzida pela PA-BJ, gioxina ou trombina, em células endoteliais. As monocamadas de CEs foram incubadas, por 1 hora, com SCH 79797 166 nM, inibidor seletivo de receptor PAR-1, antes da adição da PA-BJ 1 μ M, gioxina 1 μ M ou trombina 1 U/mL, mantidas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI (ANOVA).

4.14 Efeito da inativação da atividade catalítica da PA-BJ, giroxina e trombina na liberação de PGI₂ por em células endoteliais

Alíquotas de PA-BJ, giroxina ou trombina foram inativadas com uma solução de PMSF 2 mM, por 1 hora, a 37 °C. Outras alíquotas destas mesmas serinoproteinases foram incubadas com etanol a 1%, solvente do PMSF, pelo mesmo período.

Após este período, as monocamadas de CEs foram incubadas com a PA-BJ 1 µM ou giroxina 1 µM ou trombina 1 U/mL ativas ou inativadas pelo PMSF ou com a PA-BJ 1 µM ou giroxina 1 µM ou trombina 1 U/mL incubadas com etanol ou PMSF 0,2 mM ou etanol 0,1% ou RPMI (controle negativo), por 24 horas e a liberação de PGI₂ foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina F_{1α}.

Como demonstra a Figura 15.1, a inativação da PA-BJ pelo PMSF ou a sua incubação com etanol apenas, inibiu a liberação da PGI₂.

A Figura 15.2, mostra que a inativação da giroxina pelo PMSF reduziu significativamente a liberação de PGI₂, se comparadas com a giroxina ativa, porém, não foi diferente da inibição observada pela adição do etanol à giroxina.

O gráfico da Figura 15.3, demonstra que a inativação da trombina pelo PMSF não alterou a liberação de PGI₂, se comparada aos efeitos da trombina ativa ou incubada com o etanol.

Figura 15.1. Efeito da inativação da atividade catalítica da PA-BJ na liberação de PGI₂ por células endoteliais. As monocamadas de CEs foram incubadas com PA-BJ 1 μ M ou PA-BJ 1 μ M (inativa) ou PA-BJ 1 μ M (com etanol) ou PMSF 0,2 mM ou etanol 0,1% ou RPMI, por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A liberação de PGI₂ foi avaliada pela quantificação da 6-ceto prostaglandina F_{1α} por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI, # $p \leq 0,05$ em relação à PA-BJ, (ANOVA).

Figura 15.2. Efeito da inativação da atividade catalítica da giroxina na liberação de PGI₂ por células endoteliais. As monocamadas de CEs foram incubadas com giroxina 1 μ M ou giroxina 1 μ M (inativa) ou giroxina 1 μ M (com etanol) ou PMSF 0,2 mM ou etanol 0,1% ou RPMI, por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A liberação de PGI₂ foi avaliada pela quantificação da 6-ceto prostaglandina F_{1α} por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI (ANOVA).

Figura 15.3. Efeito da inativação da atividade catalítica da trombina na liberação de PGI₂ por células endoteliais. As monocamadas de CEs foram incubadas com trombina 1 μ M ou trombina 1 μ M (inativa) ou trombina 1 μ M (com etanol) ou PMSF 0,2 mM ou etanol 0,1% ou RPMI, por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A liberação de PGI₂ foi avaliada pela quantificação da 6-ceto prostaglandina F_{1α} por E.I.A., como descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados em pg/mL de 6-ceto prostaglandina F_{1α} e representam a média $\pm$ E.P.M. de pelo menos 3 experimentos. * $p \leq 0,05$ em relação ao RPMI (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

O endotélio desempenha um papel protetor do sistema cardiovascular e modificações desse tecido comprometem a homeostasia e desencadeiam uma resposta imediata, de componentes fisiológicos, para o retorno ao estado normal. Dada a importância do endotélio, na proteção do sistema cardiovascular e dos efeitos das serinoproteinases PA-BJ e gioxina em plaquetas, as ações destas toxinas sobre as CEs foram investigadas no presente estudo.

Os estudos iniciais, relativos à liberação da LDH, demonstraram que a PA-BJ e a gioxina não afetaram a viabilidade das CEs, nas concentrações avaliadas e períodos de incubação de até 24 horas. Da mesma maneira, a trombina, utilizada como padrão de serinoproteinases, não alterou a liberação da LDH, nos mesmos períodos de estudo. Estes dados corroboram os de LEROY *et al.* (1984), que demonstraram que a trombina não alterou a liberação basal da LDH, em CEs de aorta suína. A liberação da LDH reflete, principalmente, alterações da membrana celular. Desse modo, pode-se inferir que a PA-BJ e a gioxina não são tóxicas às membranas das CEs, nas condições experimentais empregadas. Adicionalmente, foram investigados os efeitos dessas serinoproteinases, nas mesmas concentrações e períodos de incubação, sobre a atividade metabólica das células endoteliais. Os resultados obtidos mostraram que estas proteinases, assim como a trombina, não afetaram a atividade oxidativa mitocondrial das células. Estes dados corroboram os acima descritos, que apontaram a baixa toxicidade dessas serinoproteinases sobre as CEs em cultura.

As junções interendoteliais desempenham um papel importante na regulação da permeabilidade vascular e no deslocamento de células circulantes (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1988). Assim, tendo em vista que a confluência de CEs, em monocamadas, é um aspecto crítico do ponto de vista funcional, foram avaliados os efeitos da PA-BJ e da gioxina sobre a integridade das monocamadas de células endoteliais. Os resultados obtidos demonstraram que estas toxinas não afetaram a integridade do endotélio. Estes dados indicam que estas serinoproteinases são pouco ativas sobre os constituintes envolvidos na conexão da CE aos receptores adesivos da matriz extracelular, na presente condição experimental. Da mesma maneira, a trombina não afetou este parâmetro.

Como mencionado na Introdução, o veneno da serpente *Bothrops jararaca* contém um teor elevado de serinoproteinases (SAGUCHI *et al.*, 2005) e uma ação lesiva e/ou estimulatória do veneno desta espécie e de outras do mesmo gênero, sobre o endotélio, foi demonstrada anteriormente (BARRAVIERA, 1994; GONÇALVES e MARIANO, 2000; LOMONTE *et al.*, 1994). Nesse sentido, os resultados ora obtidos sugerem que a PA-BJ não

seja um componente importante para as ações lesivas do veneno de *Bothrops jararaca* no endotélio. Por outro lado, para o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, não há dados na literatura sobre ações deste veneno sobre o endotélio, dificultando uma interpretação dos dados pré-existentes com os até aqui obtidos com a giroxina.

Como mencionado na introdução, o endotélio é um tecido metabolicamente ativo, com a capacidade de produzir inúmeras substâncias fisiologicamente ativas. Dentre estas substâncias está a PGI₂, que é o principal mediador lipídico (eicosanóide) produzido pelas células endoteliais (VANE *et al.*, 1990; VANE e BOTTING, 1995; e para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004). Este mediador exerce um importante papel fisiológico, por suas ações vasodilatadora e inibitória da agregação plaquetária. Este prostanóide é fundamental para a regulação das propriedades adesivas do endotélio, atuando de modo a impedir a adesão de células circulantes a este tecido (para revisão vide VANE e BOTTING, 1995). No entanto, em condições fisiopatológicas, em que há aumento de sua concentração, a PGI₂ pode contribuir para o desenvolvimento de processos inflamatórios (VANE *et al.*, 1990; VANE e BOTTING, 1995; para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004).

Com base nas informações acima, foram avaliados os efeitos da PA-BJ e da giroxina, na produção de PGI₂, por monocamadas de células endoteliais. Os dados obtidos mostraram que estas serinoproteinases induziram a liberação de PGI₂, após 24 horas de incubação. Como esperado, a trombina causou o mesmo efeito e no mesmo período. Em apoio a este dado, a literatura mostra que a trombina induziu a liberação de PGI₂, a partir de CEs de artéria de cordão umbilical humano, de modo rápido (15 minutos) e sustentado por até 9 horas (HOULISTON *et al.*, 2002). A diferença do perfil temporal observado em nosso estudo, em relação ao observado por estes autores, pode dever-se às diferentes linhagens de CEs utilizadas e/ou ao tipo de vaso de origem das CEs (vaso de microcirculação vs grande vaso). Os dados obtidos com a PA-BJ e com a giroxina, por sua vez, estão de acordo com a literatura, que mostra que a trombocitina, uma serinoproteinase isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox*, induziu a liberação de PGI₂, após 5 minutos de incubação, em cultura de CEs de vasos de cordão umbilical humano (CZERVIONKE *et al.*, 1979). A resposta do endotélio às serinoproteinases em estudo, com a produção de PGI₂, é intrigante, uma vez que ambas induzem a agregação plaquetária e a PGI₂ é antiagregante. Estes efeitos antagônicos não podem ser explicados até o presente, porém, é possível que a liberação deste mediador represente uma resposta do endotélio à ação tóxica das serinoproteinases, que levaria à adesão e agregação plaquetária e/ou à adesão de leucócitos circulantes a esse tecido.

Está bem estabelecido que a síntese de prostaglandinas, como a PGI₂, inicia-se pela metabolização do AA pelo complexo enzimático das ciclooxigenases. Este processo origina produtos intermediários instáveis, que são metabolizados por sintases ou isomerases terminais, originando as diferentes prostaglandinas. Na CE, predomina a prostaciclina sintase e, portanto, a síntese de PGI₂ (HOULISTON *et al.*, 2002). Quanto às enzimas COXs, até o presente, foram descritas quatro isoformas, duas das quais mais profundamente estudadas: a COX-1, expressa constitutivamente e a COX-2, induzível por estímulos inflamatórios, que também é expressa constitutivamente, em determinados tecidos (BOTTING e AYOUB, 2005; KIS *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2006).

Com base nas informações acima, avaliou-se a participação das COX-1 e -2 na produção de PGI₂, induzida pelas serinoproteinases, a partir de intervenções farmacológicas. Os resultados obtidos demonstraram que a indometacina, um inibidor não seletivo das COXs, o valeril salicilato, um inibidor seletivo da COX-1 e o etoricoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, reduziram, de modo significativo, a produção de PGI₂ induzida pela PA-BJ e pela giroxina. Estes dados indicam que as duas isoformas de COX (COX-1 e -2) estão envolvidas no efeito dessas serinoproteinases. Efeitos semelhantes foram obtidos com a trombina. Os dados obtidos com a trombina estão de acordo com a literatura, que demonstra a participação das COX-1 e -2 para a produção de PGI₂ induzida por esta enzima, em CEs de cordão umbilical humano. Como mencionado na introdução, a liberação de PGI₂ causada pela trombina, resulta da ativação de receptores PAR-1, com a fosforilação e ativação da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂), gerando o substrato AA, para a formação de PGI₂ a partir da COX-1 constitutiva. Ainda, como consequência da ativação do receptor PAR-1, há indução da expressão protéica de COX-2 com a manutenção da liberação de PGI₂ em etapa mais tardia (HOULISTON *et al.*, 2002; SYEDA *et al.*, 2006; para revisão vide WHEELER-JONES, 2008). A partir dos dados obtidos com as intervenções farmacológicas e com o intuito de detalhar o mecanismo de ação das duas serinoproteinases, foram avaliados seus efeitos na expressão protéica das COXs, pelas CEs. Os resultados obtidos demonstraram que a PA-BJ e a giroxina não induziram a expressão da COX-2 e nem afetaram a expressão constitutiva da COX-1, durante o período de tempo avaliado. Estes dados sugerem que PA-BJ e a giroxina, desencadeiam eventos celulares que estimulam a atividade catalítica das COXs já expressas pelas células endoteliais. Neste contexto, vale observar que no modelo experimental utilizado, as células controles apresentaram uma expressão basal da COX-2. Em apoio a esta observação, a literatura demonstra a expressão constitutiva de COX-2 em CEs em cultura, em condições de repouso (SYEDA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2004). Além disso, foi

demonstrado que o inibidor seletivo da COX-2, NS-398, inibiu a formação de PGI₂, em CEs de cordão umbilical humano, não estimuladas, sugerindo que um componente da produção basal deste mediador é a COX-2 constitutiva (SYEDA *et al.*, 2006). Os dados obtidos com a trombina, por sua vez, demonstraram a responsividade do modelo experimental empregado, uma vez que foi detectado o aumento da expressão protéica da COX-2, desde a 6^a hora, como esperado (SYEDA *et al.*, 2006). De outra parte, o aumento da expressão da COX-1, causado pela trombina, sugere que esta serinoproteínase tenha a capacidade de estimular vias de síntese dessa isoforma, como foi observado em outros modelos experimentais, sob estimulação por patógenos (DORE *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 1999; SUGIMOTO *et al.*, 2007).

A partir do conhecimento de que a trombina induz a produção rápida de PGI₂ e a expressão de COX-2, via ativação de receptores PAR-1 (HOULISTON *et al.*, 2002; STEINHOFF *et al.*, 2005) e considerando que a PA-BJ cliva o receptor PAR-1 recombinante (SANTOS *et al.*, 2000), avaliou-se a participação do receptor PAR-1, na produção de PGI₂ induzida tanto pela PA-BJ quanto pela gioxina, embora, neste caso, não se conheça a sua interação com este tipo de receptor. Os resultados demonstraram que o SCH 79797, um inibidor seletivo de receptor PAR-1, não alterou a produção de PGI₂ induzida pela PA-BJ ou pela gioxina e nem pela trombina. Estes dados sugerem que na linhagem de CEs utilizadas, a produção de PGI₂, induzida por essas serinoproteínases, não é mediada pela ativação de receptores do tipo PAR-1. Contudo, em função dos resultados obtidos com a trombina, não podemos descartar a possibilidade das CEs utilizadas no presente estudo não expressarem tais receptores.

A seguir, tendo em vista que o sítio catalítico das serinoproteínases é responsável pela clivagem de peptídeos e ativação de receptores, em especial os receptores do tipo PAR, avaliou-se a participação da atividade catalítica da PA-BJ e da gioxina na produção de PGI₂ pelas CEs. Para tanto, procedeu-se a inativação dessa atividade, pela sulfonilação irreversível do sítio catalítico das serinoproteínases pelo reagente fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Os resultados obtidos demonstraram que a atividade catalítica não é importante para a liberação de PGI₂, pelas CEs, frente ao estímulo pelas serinoproteínases em estudo. Estes dados reforçam os anteriores, que sugerem que o receptor PAR-1 não esteja envolvido na liberação de PGI₂ pelas CEs, uma vez que a atividade catalítica das serinoproteínases é necessária para a clivagem e ativação deste receptor.

Neste contexto, deve-se considerar os estudos recentes que demonstraram que a trombina pode exercer efeitos no endotélio por mecanismos adicionais àqueles relacionados à

sua atividade catalítica, como por exemplo, a inibição da apoptose de CEs, a partir de sua interação com as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ (ZANIA *et al.*, 2008). As integrinas são receptores de superfície celular, formados por duas subunidades, denominadas de α e β . Estes receptores podem ligar-se a várias moléculas (para revisão *vide* RÜEGG *et al.*, 2003). Após serem ativadas, induzem a expressão protéica de COX-2 e a produção de PGE₂, em células endoteliais de cordão umbilical humano (ZARIC e RÜEGG, 2005). Em adição, foi demonstrado que a integrina $\alpha 5\beta 1$ regula, positivamente, a atividade catalítica e a expressão gênica e protéica da COX-2 também em cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (VIJI *et al.*, 2008). Desse modo, a partir dessas informações, pode-se sugerir que a ativação de integrinas represente um mecanismo pelo qual as serinoproteinases em estudo induzam a liberação de PGI₂ no presente modelo experimental. Esta hipótese, contudo, necessita ser investigada.

De outra parte, vale analisar os resultados que demonstraram que os solventes DMSO e o etanol afetaram a produção de PGI₂, causada pela PA-BJ, mas não pela giroxina ou pela trombina. Uma provável explicação para este fato seria a capacidade demonstrada do DMSO induzir a translocação de moléculas de lipídeos e sua re-distribuição entre as faces externa e interna da membrana celular, em evento conhecido como *flip-flop*, causando uma diminuição da espessura da membrana celular e mudança na carga iônica dos lipídeos da superfície da mesma (GURTOVENKO *et al.*, 2008). De modo similar, dados da literatura demonstraram que o etanol causa uma diminuição na espessura da membrana celular, também, por alterações na posição dos lipídeos na bicamada dessas membranas (PARK *et al.*, 2009). A partir dessas informações, podemos sugerir que a posição e/ou as cargas iônicas dos lipídeos de superfície da membrana celular seja um aspecto importante para a interação da PA-BJ com as CEs e, conseqüentemente, para o desencadeamento de sua ação sobre as mesmas. Por outro lado essas alterações não parecem afetar a interação da giroxina e da trombina, com seus sítios aceptores nas mesmas células.

O significado das ações da PA-BJ e da giroxina, aqui demonstradas, em relação aos efeitos do veneno total de *Bothrops jararaca* ou de *Crotalus durissus terrificus*, necessitam de mais estudos para sua compreensão. Embora façam parte de venenos com ações distintas, estas duas serinoproteinases apresentaram efeitos isolados semelhantes. A contribuição da PGI₂ liberada pelo endotélio em resposta à PA-BJ e à giroxina, para ação dos venenos totais de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*, respectivamente, pode estar relacionada à vasodilatação, que pode facilitar a passagem destas e de outras toxinas do veneno, do lúmen dos vasos para os tecidos, favorecendo seus efeitos. Além disso, a potente ação vasodilatadora

da prostaciclina, liberada por ação da PA-BJ, pode contribuir para o efeito hipotensor, observado no envenenamento pela serpente *Bothrops jararaca* (ABDALLA *et al.*, 1989; COMEAU *et al.*, 1992). Por outro lado, a inibição da agregação plaquetária causada pela PGI₂, pode representar um mecanismo adicional, pelo qual a PA-BJ contribui para o efeito hemorrágico observado em acidentes causados pela esta serpente. No caso do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a PGI₂ liberada pela giroxina contribua para a incoagulabilidade, observada em pelo menos 50% dos indivíduos acidentados por estas serpentes. Porém, nossos resultados não permitem inferir se a liberação de PGI₂ e a conseqüente inibição da agregação plaquetária, seja, preponderante em relação ao efeito agregante de plaquetas causado pela PA-BJ.

Em conjunto, os resultados ora obtidos demonstraram, pela primeira vez, que as serinoproteinases PA-BJ e giroxina, em concentrações não tóxicas para as CEs, induziram a liberação de PGI₂ por estas células. Este efeito é dependente da ativação dos sistemas enzimáticos da COX-1 e COX-2 e independe da ativação de receptores do tipo PAR-1. Além disso, o sítio catalítico dessas serinoproteinases não parece ser relevante para o seu efeito, nas CEs empregadas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As serinoproteinases PA-BJ e giroxina não afetaram a viabilidade, o metabolismo nem a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura em nenhuma das concentrações estudadas;
- ✓ Em concentrações não-citotóxicas, a PA-BJ e a giroxina induziram aumento da produção de prostaciclina pelas células endoteliais;
- ✓ A produção de prostaciclina induzida pela PA-BJ e pela giroxina em células endoteliais, não está relacionada ao aumento da expressão protéica de COX-1 ou -2, mas depende da atividade enzimática dessas duas isoformas;
- ✓ A atividade catalítica da PA-BJ ou da giroxina não são importantes para seu o efeito estimulatório da produção de prostaciclina em células endoteliais;
- ✓ O receptor PAR-1 não participa do efeito estimulatório das serinoproteinases PA-BJ ou giroxina sobre a produção de prostaciclina por células endoteliais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. M. F.; HIRAICHI, E.; PICARELLI, Z. P.; PREZOTO, B. C. Kallikrein–kinin system in the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, p. 252-258, 1989.

AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.

ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, n. 1, p. 148-153, 1993.

ARLAUD, G. J.; VOLANAKIS, J. E.; THIELENS, N. M.; NARAYANA, S. V.; ROSSI, V.; XU, Y. The atypical serine proteases of the complement system. **Adv. Immunol.**, v. 69, p. 249-307, 1998.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE C. M. S.; HADDA JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 2003. p. 91-107.

BARRAVIERA, B. **Venenos e animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 1994, p. 411.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Introduction: serine peptidases and theirs clans. In: BARRETT, A. J.; RAWLING, N. D.; WOESSNER, J. F. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 3-4.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 318, n. 2, p. 247-250, 1995.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Lat. Am.**, v. 11, p. 224-230, 1961.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicon. – Toxins Rev.**, v. 7, p. 121-209, 1988/89.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostases. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BOTTING, R. e AYOB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostagl. Leuk. Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85-87, 2005.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998. Review.
- CIRINO, G. Multiple controls in inflammation: Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 1998.
- COMEAU, S.; LANCE, V. A.; HICKS, J. W.; CONLON, J. M. Purification and biological activity of alligator bradykinin. **Am. J. Physiol.** v. 263, p. R400-R404, 1992.
- CZERVIONKE, R. L.; SMITH, J. B.; HOAK, J. C.; FRY, G. L.; HAYCRAFT, D. L. Use of radioimmunoassay to study thrombin-induced release of PGI₂ from cultured endothelium. **Thromb. Res.**, v. 14, p. 781-786, 1979.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.
- DEMPFLE, C. E.; KOHL, R.; HARENBERG, J.; KIRSCHSTEIN, W.; SCHLAUCH, D.; HEENE, D. L. Coagulopathy after snake bite by *Bothrops neuwiedi*: case report and results of *in vitro* experiments. **Blut.**, v. 61, n. 6, p. 369-374, 1990.
- DERY, O.; CORVERA, C. U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N. W. Proteinase-activated: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 1429- 1452, 1998.
- DORE, M.; COTE, L. C.; MITCHELL, A.; SIROIS, J. 1998. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 46, p. 77-84, 1998.
- FRANCO, L.; TALAMINI, G.; CARRA, G.; DORIA, D. Expression of COX-1, COX-2, and inducible nitric oxide synthase protein in human gastric antrum with *Helicobacter pylori* infection. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 58, n. 1, p. 9-17, 1999.
- FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, n. 3, p. 245-257, 1999.
- GEARING, K. L.; GÖTTLICHER, M.; TEBOUL, M.; WIDMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. **Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 4, p. 1440-1444, 1993.
- GONÇALVES, R. L.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2000.
- GRYGLEWSKI, R. J. Prostacyclin as a circulatory hormone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, n. 21, p. 3161-3166, 1979.
- GURTOVENKO, A. A.; ONIKE, O. I.; ANWAR, J. Chemically induced phospholipid translocation across biological membranes. **Langmuir**, v. 24, p. 9656-9660, 2008.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.

- HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. (Eds.). **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 1998. p. 3-4.
- HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.
- HEBERT, J. M.; DUPUY, E.; LAPLECE, M. C.; ZINI, J. M.; BAR, S. R.; TOBELEM, G. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. **Biochem. J.**, v. 303, n. 1, p. 227-231, 1994.
- HOGGE, A.R.; ROMANO-HOGGE, SARWL. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the vipers Vipeoidea, Viperidea, Crotaline. **Mem. Inst. Butantan**, 1978; 42: 179-310.
- HOULISTON, R. A.; KEOGH, R. J.; SUGDEN, D.; DUDHIA, J.; CARTER, T. D.; WHEELER-JONES, C. P. D. Protease-activated receptor upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. **Thromb. Haemost.**, v. 88, n. 2, p. 321-328, 2002.
- HUANG, S.; INGBER, D. E. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. **Exp. Cell. Res.**, v. 261, n. 1, p. 91-103, 2000.
- ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**. v. 347, n. 6294, p. 645-650, 1990.
- ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 7, p. 3132-3135, 1987.
- KADL, A.; LEITINGER, N. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 7, n. 11-12, p. 1744-1754, 2005.
- KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I. S.; NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, n. 2, p. 199-204, 1986.
- KATORI, M.; MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. **Inflamm. Res.**, v. 49, n. 8, p. 367-392, 2000. Review.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1387-1422, 1990.
- KIRBY, E. P.; NIEWIAROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, C.; SHAW, E.; BRUDZYNSKI, T. M. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**. v. 18, n. 16, p. 3564-3570, 1979.
- KIS, B.; SNIPES, J.; GASPAR, T.; LENZSER, G.; TULBERT, C.; BUSIJA, D. W. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 274-278, 2006.
- KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; NOONAN, D. J.; HEYMAN, R. A.; EVANS, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**. v. 358, n. 6389, p. 771-774, 1992.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAN, R. S.; KNIGHT, D. A.; STEWART, G. A.; HENRY, P. J. Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 1, p. 93-100, 2001.
- LEROY, E. C.; ANGER, A.; GORDON, J. L. Effects of neutrophil elastase and other proteases on porcine aortic endothelial prostaglandin I₂ production, adenine nucleotide release, and responses to vasoactive agents. **J. Clin. Invest.**, v. 74, p. 1003-1010, 1984.
- LI, T.; HE, S. Induction of IL-6 release from human T cells by PAR-1 and PAR-2 agonists. **Immunol. Cell Biol.**, v. 84, n. 5, p. 461-466, 2006.
- LIOU, J. Y.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N.; LEE, S.; WU, K. K. Prostacyclin inhibits endothelial cell XIAP ubiquitination and degradation. **J Cell Physiol.**, v. 212, p. 840-848, 2007.
- LOESCH, A. Localization of endothelin-1 and its receptors in vascular tissue as seen at the electron microscopic level. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 3, n. 4, p. 381-392, 2005. Review.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 505-510, 1994.
- LUDEMAN, M. J.; KATAOKA, H.; SRINIVASAN, Y.; ESMON, N. L.; ESMON, C. T.; COUGHLIN, S. R. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 13, p. 13122-13128, 2005.
- MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, O. B. Arch. Biochem. Biophys., v. 104, p. 369-374, 1964.
- MARKLAND JR, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 54, n. 3, p. 1-10, 1997.
- MARKLAND JR, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G. Enzymes: biological catalysts. In: ____ (Eds.). **Biochemistry**. 3. ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, 2000. p. 360-409.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em saúde. **Vigilância dos acidentes por animais peçonhentos**. DEVEP/CGDT/COVEV, 2004.
- MCNAMARA, C. A.; SAREMBOCK, I. J.; GIMPLE, L. W.; FENTON, J. W.; COUGHLIN, S. R.; OWENS G. K. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. **J. Clin. Invest.**, v. 91, n. 1, p. 94-98, 1993.

- MITCHELL, J. A.; ALI, F.; BAILEY, L.; MORENO, L.; HARRINGTON, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 1, p. 141-147, 2007.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.** v. 110, n. 3, p. 371-385, 2005.
- NEREM, R. M.; HARRISON, D. G.; TAYLOR, W. R.; ALEXANDER, R. W. Hemodynamics and vascular endothelial biology. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 21, n. 1, p. S6-S10, 1993.
- NEWMAN, P. J. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. *J. Clin. Invest.*, v. 99, p. 3-8, 1996.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, v. 33, n. 7, p. 1843-1849, 1994.
- O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, v. 330, n. 2, p. 156-160, 1993.
- OTERO, R., GUTIÉRREZ, J., BEATRIZ MESA, M., DUQUE, E., RODRÍGUEZ, O., LUIS ARANGO, J., GÓMEZ, F., TORO, A., CANO, F., MARÍA RODRÍGUEZ, L., CARO, E., MARTÍNEZ, J., CORNEJO, W., MARIANO GÓMEZ, L., LUIS URIBE, F., CÁRDENAS, S., NÚÑEZ, V., DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.
- OWNBY, C. L.; BJARNASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol.**, v. 93, n. 1, p. 201-218, 1978.
- OWNBY, C. L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier, W. T.; Mebs, D. (Eds.). **Handbook of Toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 602-654.
- PARK, J. S.; CHOI, E. J.; JEONG, D. S.; YANG, H. J.; KIM, K. P.; SON, K. K.; LEE, H. W.; KANG, M. J.; KIM, S. M.; CHUNG, I. K.; BAE, M. K.; JANG, H. O.; YUN, I. Effects of dimyristoylphosphatidylethanol and ethanol on thickness of neuronal membrane lipid bilayers. **Arch Pharm.**, v. 32, p.1469-1473, 2009.
- PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. **Clin Immunol.**, v. 119, p. 229-240, 2006.
- PARRY, M. A.; JACOB, U.; HUBER, R.; WISNER, A.; BON, C.; BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1195-1206, 1998.
- PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. A evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 48, p. 29987-29990, 1997.

- PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific And Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thromb. Haemost.**, v. 79, n. 3, p. 675-683, 1998.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.
- ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, n. 5, p. 603-630, 2002.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BURCHEL, W. e BUCKLEY, E. E. (Eds). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. v. 2, p. 345-403.
- RÜEGG, C; MARIOTTI, A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. **Cell Mol Life Sci. Jun**, v.60, p.1135-1157, 2003.
- SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2005.
- SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds). **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 289-309.
- SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M. T.; KULIOPULOS, A; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with trombin receptors on human platelets. **FEBS Lett.**, v. 477, n. 3, p. 199-202, 2000.
- SCOTT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGOOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A₂ - cyclooxygenase pathways in inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 535-541, 1999.
- SEEGERS, W. H.; OUYANG, C. Snake venoms and blood coagulation. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer, 1979. p. 684-750.
- SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235-247, 1980.
- SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.*, v. 251, n. 3, p. 845-853, 1998.
- SERRANO, S. M. T.; 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. Review.
- SERRANO, S. M. T.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A. M.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, n. 34, p. 7186-7193, 1995.

- SERRANO, S. M.; MATOS, M. F.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom--I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon.**, v.31, n. 4, p.; 471-481, 1993.
- SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thromb. Haemost.**, v. 83, n. 3, p. 438-444, 2000.
- SIMIONESCU, M.; SIMIONESCU, N. Endothelial transport macromolecules: transcytosis and endocytosis. **Cell. Biol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 1-78, 1991.
- SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. The cardiovascular system. In: WEISS, L. (Ed.). **Cell and Tissue Biology**. Germany: Urban e Schwarzenberg, 1988. p. 353-400.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004. Review.
- SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 145-182, 2000.
- STEINHOFF, M.; BUDDENKOTTE, J.; SHPACOVITH, V.; RATTENHOLL, A.; MOORMANN, C.; VERGNOLLE, N.; LUGER, T. A.; HOLLENGER, M. D. Proteinase-activates receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. **Endocr. Rev.**, v. 26, n. 1, p. 1-43, 2005. Review.
- STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 265-273, 1982.
- STUBBS, M. T.; BODE, W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin structure. **Thromb. Res.**, v. 69, n. 1, p. 1-58, 1993.
- SUGIMOTO, T.; KOIZUMI, T.; SUDO, T.; YAMAGUCHI, S.; KOJIMA, A.; KUMAGAI, S.; NISHIMURA, R. Correlative expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1) and human epidermal growth factor receptor type-2 (Her-2) in endometrial cancer. **Kobe J Med Sci.**, v. 53, p. 177-87, 2007.
- SYEDA, F.; GROSJEAN, J.; HOULISTON, R. A.; KEOGH, R. J.; CARTER, T. D.; PALEOLOG, E.; WHEELER-JONES, C. P. D. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cell require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 17, p. 11792-11804, 2006.
- TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. **Toxicon**, v. 32, p. 419-426, 1994.
- THUILLEZ, C.; RICHARD, V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. **J. Hum. Hypertens.**, v. 19, n. 1, Suppl. 1, p. S21-S25, 2005. Review.
- VANE, J. R.; ANGEGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990.

- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. **Am. J. Cardiol.**, v. 75, n. 3, p. 3A-10A, 1995.
- VANE, J.; CORIN, R. E. Prostacyclin: a vascular mediator. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 26, n. 6, p. 571-578, 2003. Review.
- VANE, J. R.; GRYGLEWSKI, R. L. BOTTING, R. M. The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 8, p. 491-496, 1987.
- VIII, R. I.; SAMUEER KUMAR, M. S.; SUDHKARAN, P. R. Modulation of cyclooxygenase in endothelial cells by fibronectin: relevance to angiogenesis. **J. Cell. Biochem.**, v. 105, p. 158-166, 2008.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Serina proteases. In: ____ (Eds.). **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 281-318.
- WANG, Y.; KODANI, E.; WANG, J.; ZHANG, S. X.; TAKANO, H.; TANG, X. L.; BOLLI, R. Cardioprotection during the final stage of the late phase of ischemic preconditioning is mediated by neuronal NO synthase in concert with cyclooxygenase-2. **Circ Res.**, v. 95, p. 84-91, 2004.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FASEB J.**, v. 18, p. 790-804, 2004. Review.
- WHEELER-JONES, C. P. Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by Protease-activated receptors: mechanisms and significance. **Pharmacol. Rep.**, v.60, p. 109-118, 2008. Review.
- WHEELER-JONES, C. P.; MAY, M. J.; HOULISTON, R. A.; PEARSON, J. D. Inhibition of MAP kinase (MEK) blocks endothelial PGI₂ release but has no effect on von Willebrand factor secretion or E-selectin expression. **FEBS Lett.**, v. 388, n. 2-3, p. 180-184, 1996.
- YANAGISAWA, M.; KUHIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSILL, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produces by vascular endothelial cell. **Nature**, v. 332, p. 411-415, 1988.
- ZIMMERMAN, G. A; PRESCOTT, M. S.; McINTYRE, M. T. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, v. 13, 3, p. 93-100, 1992.
- ZANIA P, PAPAConstantinou M, FLORDELLIS CS, MARAGOUdakis ME, TSOPANOgLOU NE. Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 294, p. C1215-1226, 2008.
- ZARIC J, RÜEGG C. Integrin-mediated adhesion and soluble ligand binding stabilize COX-2 protein levels in endothelial cells by inducing expression and preventing degradation. **J. Biol. Chem.**, V.280 p. 1077-1085, 2005.