

**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

## **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, Fábria, 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 (PGI<sub>2</sub>) 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 PGI<sub>2</sub>, 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 PGI<sub>2</sub> 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 PGI<sub>2</sub>, no endotélio, induzida pelas serinoproteinases em estudo. Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram que as serinoproteinases PA-BJ e giroxina induziram a liberação de PGI<sub>2</sub> 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; Ciclooxigenases; 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 (PGI<sub>2</sub>) 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 PGI<sub>2</sub> 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

<b>Figura 1.</b>	<b>Mecanismo de ativação de receptor PAR-1 por serinoproteinasas .....</b>	<b>03</b>
------------------	--	-----------

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>Considerações gerais sobre o endotélio .....</b>	<b>6</b>
<b>Considerações gerais sobre os prostanóides e ciclooxigenases.....</b>	<b>8</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>12</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes têm grande importância na clínica médica e na pesquisa científica, uma vez que os acidentes ofídicos são, ainda, frequentes 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 A<sub>2</sub>, 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).

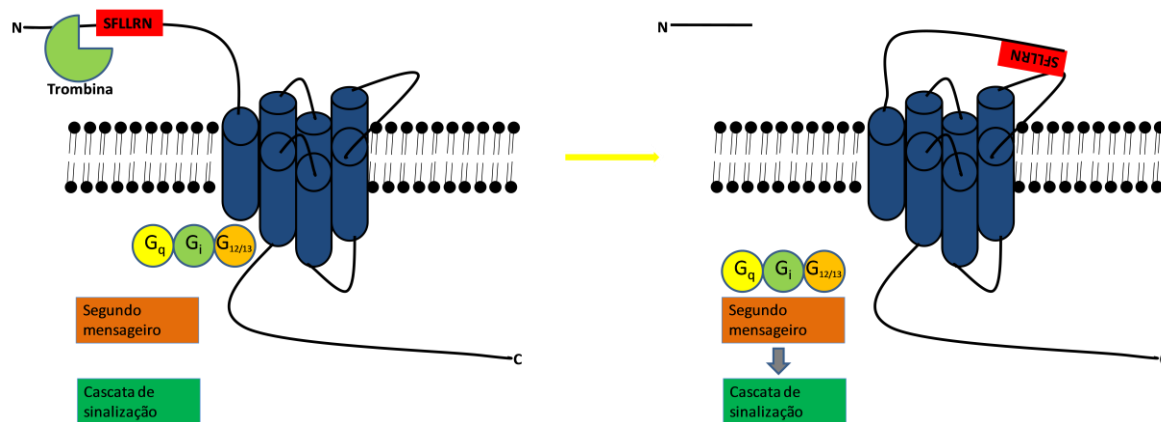


Figura 1. Mecanismo de ativação de receptor PAR-1 por serinoproteinases, modificado a partir de WHEELER-JONES (2008).

As serinoproteinases de venenos (SPVs) pertencem à família S1 do clã SA (HALFON e CRAIK, 1998). Apesar do alto grau de identidade na seqüência 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 diisopropilfluorfosfato (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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>), o principal metabólito do ácido araquidônico (AA), gerado pelo endotélio e aumento da expressão da ciclooxigenase-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<sub>2</sub> 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 seqüência 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 Asn<sup>20</sup> e Ser<sup>23</sup> (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-símiles; 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>, 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 A<sub>2</sub>, 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- $\alpha$ ), 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 endoperóxido sintase que oxigena e cicliza o AA, para formar o endoperóxido PGG/ PGG<sub>2</sub>, e uma atividade peroxidase, que reduz o grupo 15-hidroperoxi deste metabólito, para formar a PGH<sub>2</sub>. Estas são quimicamente instáveis e sofrem a ação de sintases específicas, originando uma variedade de prostanoídes (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 PGI<sub>2</sub>, 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- $\kappa$ B, antagonizando este fator, responsável pela ativação da expressão de genes pró-inflamatórios. Dentre os genes

pró-inflamatórios, regulados negativamente pelo PPAR, esta o SR-A, que codifica a proteína de superfície celular, associada a eventos de adesão celular e à enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ISSEMANN e GREEN, 1990; GEARING *et al.*, 1993; KLIEWER *et al.*, 1992; FRUCHART *et al.*, 1999, MORAES *et al.*, 2005).

Devido a estas ações, a PGI<sub>2</sub> 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 PGI<sub>2</sub> 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 PGI<sub>2</sub> é rapidamente convertida, por processos não-enzimáticos, em um metabólito inativo, a 6-ceto prostaglandina F1 $\alpha$  (PGF1 $\alpha$ ). 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 PGI<sub>2</sub> 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 CONCLUSÕES

- ✓ As serinoproteinases PA-BJ e gioxina 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 gioxina induziram aumento da produção de prostaciclina pelas células endoteliais;
- ✓ A produção de prostaciclina induzida pela PA-BJ e pela gioxina 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 gioxina 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 gioxina 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 PGI<sub>2</sub> 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.
- HOGUE, A.R.; ROMANO-HOGE, SARWL. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the vipers Viperidae, Viperidae, Crotalinae. **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.
- ISSELMANN, 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 I<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> 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. 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 A<sub>2</sub> - 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.; ANGGARD, 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 PGI<sub>2</sub> 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, PAPACONSTANTINO 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.