

AÇÃO DA GIROXINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA

Juliana Luly Hashizume e Maria A. P. Camillo

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Centro de Biologia Molecular

INTRODUÇÃO

O endotélio é responsável pela regulação do sistema cardiovascular e a fonte de muitos fatores que influenciam o fluxo sanguíneo, a coagulação e a angiogênese. O endotélio pode ser considerado o maior órgão do corpo; sendo formado por uma monocamada de células envolvidas no tônus vascular e na liberação de substâncias vasoativas. Estas características o elegeram ao longo da evolução, um alvo importante para a ação de diversos componentes dos venenos ofídicos. Por outro lado, estas moléculas tem sido uma fonte muito importante no desenvolvimento de novos fármacos devido a alta especificidade nos diversos sistemas fisiológicos.

A giroxina é uma serinoprotease presente no veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*. Possui atividade coagulante, hipotensora e é responsável por uma síndrome neurotóxica denominada rolamento em barril. Resultados recentes sugerem que a atividade neurotóxica apresentada pela giroxina seja decorrente de ação indireta, através de um mediador capaz de induzir o giro [1].

Considerando a comprovada participação do óxido nítrico no controle da pressão arterial e em diversos processos neurológicos, o NO pode estar envolvido no mecanismo de ação desta toxina.

Este trabalho está inserido na Atividade 19 do Plano Diretor 2005 do IPEN – "Biofármacos derivados de toxinas animais".

OBJETIVO

Neste trabalho será abordada a possibilidade da ação direta da giroxina sobre células endoteliais em cultura, avaliando-se a atividade das enzimas óxido nítrico sintase endotelial e induzida.

METODOLOGIA

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido do CEVAP, UNESP, Botucatu. A giroxina foi purificada por cromatografia de gel filtração e afinidade [1]. As células endoteliais ECV304 foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 5% de antibiótico e fungicida, a 37°C com 5% de CO₂. Para o ensaio foram distribuídas 90.000 células/placa (5 cm de diâmetro) e cultivadas por 48 horas. Em seguida, foram cultivadas por mais 12 horas com o meio sem SFB. A giroxina foi diluída em meio sem SFB nas concentrações de 1µg e 5µg/2 mL e colocada em contato com as células por 15, 55, 95 e 135 minutos. Decorrido o intervalo de tempo, o meio com a giroxina foi aspirado, as células foram removidas das placas com "scraper", em PBS gelado, e centrifugadas a 2000g por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado estocado a -80°C. Para a determinação da atividade da NOS foi utilizado o método que avalia a conversão de ³H.arginina em ³H.citrulina [2] (FIG.1).

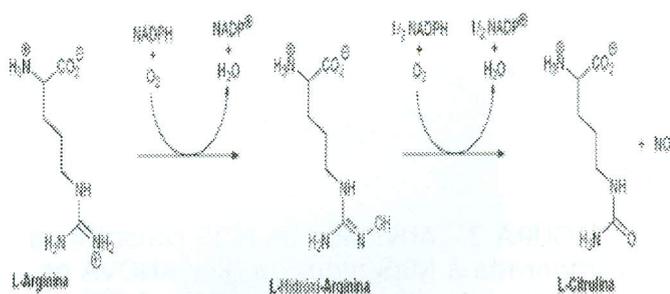


FIGURA 1 - Reação de conversão da L-arginina em L-citrulina catalisada pela NO sintase.

RESULTADOS

Observou-se um aumento significativo da atividade da NOS total quando comparada ao controle, sendo que aos 15 minutos ocorreu a

maior diferença (FIG.2). No entanto, quando comparada a NOS total e a NOS induzida a diferença não foi significativa (FIG.3). Portanto, a ativação observada ocorreu com a e-NOS.

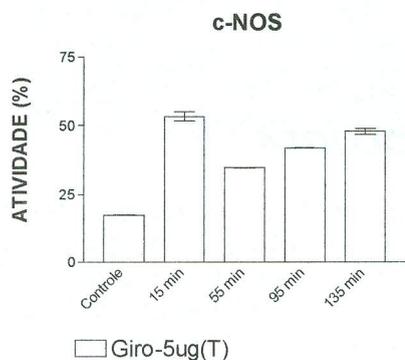


FIGURA 2 - Atividade da NOS constitutiva em diferentes tempos de ação da gioxina. Por ANOVA todos os grupos diferem do controle ($p < 0,01$).

A ativação da e-NOS resulta na liberação de óxido nítrico, e este se difunde através da membrana e penetra na célula muscular lisa levando à vasodilatação (FIG.3).

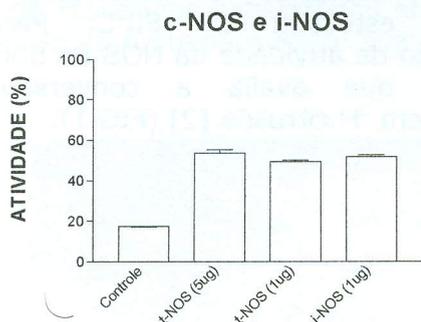


FIGURA 3 - Atividade da NOS constitutiva comparada à NOS induzida. Por ANOVA os grupos não diferem entre si ($p > 0,05$).

CONCLUSÕES

Este resultado comprova a ação da gioxina diretamente na célula endotelial ativando a e-NOS, portanto, sugerindo a participação do óxido nítrico na hipotensão induzida pela toxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAMILLO, M.A.P; ARRUDA PAES, P.C.; TRONCONE, L.R.P.; ROGERO, J.R. Gyroxin fails to modify *in vitro* release of labelled DA and ACH from rats and mouse striatal tissue. **Toxicol**, 39: 843-853. 2001.
- [2] GLEZER, I.; MUNHOZ, CD; KAWAMOTO, EM; MARCOURAKIS, T; AVELAAR, MCW; SCAVONE, C.MK.801 and 7-NI attenuates the activation of brain NF- κ B induced by LPS. **Neuropharmacol.**, 45(8):1120-9, 2003.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC