

ELEN CRISTINA TEIZEM LANDUCCI

**PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CROTOXINA E DE SUAS
SUB-UNIDADES CROTAPOTINA E FOSFOLIPASE A₂ SOBRE
AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS.**

Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do Título de Mestre
em Farmacologia.


Orientador da Tese: Gilberto de Nucci

Campinas

1992

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, pela médica ELEN CRISTINA T. LANDUCCI.

Campinas, 05 de novembro de 1992


Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -

**Todo saber é vão,
exceto quando há trabalho.
Todo trabalho é vazio,
exceto quando há amor.
O trabalho é o amor feito visível.
Gibran Kalil Gibran
(1883-1931)**

**"Mais do que máquinas,
precisamos de humanidade,
mais do que inteligência,
precisamos de afeição e doçura."**

Charlie Chaplin

Dedico,

Ao Renan.

Ao Marcelo.

Aos meus pais, Edmir e Eneida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, orientador deste trabalho, pela amizade e por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira e Prof. Dr. Sergio Marangoni, pela orientação bioquímica, pelo incentivo e oportunidade.

Ao Prof. Antonio Condino Neto, pelo auxílio e colaboração na técnica de agregação plaquetária.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, pela discussão do trabalho e pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e Prof. Dr. José Camilo Novello, pelo carinho e amizade.

Ao Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Prof. Dr. Carlos Alberto Magna pelo apoio.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação do Laboratório de Farmacologia Clínica do Departamento de Farmacologia e do Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica pela convivência agradável.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia e Departamento de Bioquímica da UNICAMP que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Biosintética Laboratórios, pela possibilidade de darmos continuidade a este projeto.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	7
LISTA DE MATERIAIS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ABSTRACT	67

LISTA DE ABREVIações

AII	Adrenalina
AA	Acido araquidônico
AAS	Acido acetil-salicílico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATZ	Anilintiazolinona
BK	Bradicinina
CK	Creatinina quinase
CRTX	Crotoxina
DTT	Ditiotreitol
DAG	Diacilglicerol
EDRF	Fator relaxante derivado de endotélio
5-HT	Serotonina
IP ₃	Inositol trifosfato
PAF	Fator ativador de plaqueta
PGDF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PRP	Plasma rico em plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
12-HETE	Ácido-hidroxi-eicosatetraenóico
12-HPETE	Ácido 12-hidroperóxido-eicosatetraenóico

HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
ILO	Iloprost
INDO	Indometacina
NO	Óxido nítrico
p-BPF	Brometo de p-bromofenacil
PGI ₂	Prostaciclina
PITC	Fenilisocianato
PTH	Feniltioidantoína
PTH- S CMCYs	Feniltioidantoína-S-carboximetil cisteína
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNP	Nitroprussiato de Sódio
TC	Tempo de coagulação
TFA	Ácido trifluoroacético
TMA	Trimetilamina Tricina- N-Tris (hidroximetil-glicina) Tris - Tris (Hidroximetil) aminometano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
U 46619	11 α -9 α epoximetano prostaglandina H ₂

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
6-oxo-PGF _{1a}	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
Acetonitrila	Aldrich Fine Chemicals, Inc.(Milwaukee, WI, EUA)
Ácido fórmico	Aldrich Fine Chemicals, Inc.(Milwaukee, WI, EUA)
Albumina	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Anidrase carbônica	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Soro Anti-TXB ₂	Dr. J.A. Salmon (Wellcome Res.Lab., Beckenham, GB)
SoroAnti-6-oxo-PGF ₁ α	Dr. J.A. Salmon (Wellcome Res.Lab., Beckenham,GB)
Banho de circ. refrigerada	Hoefer Sci.Instr. (San Francisco, CA, EUA)
Bicarbonato de amônio	BioRad (Richmond, CA, EUA)
Bradicinina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Carbonato de sódio	Merck (Alemanha)
Carvão ativado	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Cloreto de cálcio bi-hidratado	Merck (Alemanha)
Cloreto de potássio	Merck (Alemanha)
Cloreto de sódio	Merck (Alemanha)
Comassie blue	Bio-Rad Labs. (CA, EUA)
Deoxicolato de sódio	Merck (Alemanha)
Dexametasona	Merck (Alemanha)
Dextran	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Éter etílico	Merck (Alemanha)
Formiato de amônio	Merck (Alemanha)
Fosfato de potássio	Merck (Alemanha)

Fosforilase B	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Hidróxido de amônio	Aldrich Fine Chemicals, Inc.(Milwaukee, WI, EUA)
Hidróxido de sódio	Merck (Alemanha)
Indometacina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Iloprost	Schering
Inibidor de Tripsina de Soja	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
α -Lactoalbumina	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Nitroprussiato de Sódio	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Ovalbumina	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Sais para tampão	Merck (RJ, Brasil)
Sephadex G-75	Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suécia)
Sist. Mighty Small II SE 250	Hoefer Sci. Instr.(San Francisco, EUA)
SP-Sephadex C-25	Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suécia)
Sulfato de magnésio	Merck (Alemanha)
Tampão anódico	Bio-Rad Labs.(Richmond, California, EUA)
Tampão catódico	Bio-Rad Labs.(Richmond, California, EUA)
Tampão Tris	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Trombina bovina	Roche (Suíça)
Tromboxano B ₂	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
U 46619	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	Instituto Butantan (SP, Brasil)
³ H-Tromboxano B ₂	Amersham (Bucks, GB).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de Fosfolipases e Pontos de Hidrólise	42
Figura 2- Homologia Sequencial das Fosfolipases	43
Figura 3 - Perfil Cromatográfico do Fracionamento do veneno de <i>C.d.terrificus</i> em Sephadex G-75	44
Figura 4 - Perfil Cromatográfico do Fracionamento da Crotoxina em SP-Sephadex C 25	45
Figura 5 - Cromatografia da Crotoxina em HPLC	46
Figura 6 - Cromatografia da Fosfolipase A ₂ em HPLC	46
Figura 7 - Cromatografia da Crotapotina em HPLC	46
Figura 8 - Gel Tricina SDS-Page	47
Figura 9 - Curva Dose-Resposta da Crotoxina na Agregação de Plaquetas Humanas Lavadas	48
Figura 10 - Curva Dose-Resposta da Crotoxina, PLA ₂ e Crotapotina na Agregação de Plaquetas	49
Figura 11 - Inibição da Agregação Induzida por Crotoxina Através Iloprost	50
Figura 12 - Inibição da Agregação induzida por Crotoxina Através de SNP	51

LISTA DE TABELAS

TABELA I - DL ₅₀ da Crotoxina	40
TABELA II - Liberação de Tromboxano B ₂ de Plaquetas	41

RESUMO

A crotoxina, o componente mais tóxico isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, é um complexo proteico reversível composto por um peptídeo ácido, não tóxico e sem atividade enzimática (crotopotina) e um componente básico, responsável pela toxicidade do complexo, a fosfolipase A₂ (PLA₂)

Sabendo-se que várias proteínas isoladas a partir de venenos interferem na coagulação sanguínea e agregação plaquetária, o objetivo deste trabalho foi o estudo da atividade da crotoxina sobre a agregação plaquetária. A crotoxina foi isolada através de gel filtração do veneno bruto em uma coluna de Sephadex G-75, eluída com tampão bicarbonato de amônio (0.1 M; pH 8.0). A agregação das plaquetas humanas lavadas foi monitorada utilizando-se um agregômetro Payton e a liberação de TXA₂ foi medida através de radioimunoensaio (RIA). O fracionamento de 100 mg de veneno, resultou em três principais picos, sendo o segundo pico correspondente à crotoxina. O grau de pureza da crotoxina foi confirmado, utilizando-se o método de cromatografia de alto desempenho (HPLC) através de uma coluna C 18 μ Bondapack.

Crotoxina (15-50 μ g/ml), produz uma agregação de plaquetas lavadas de modo dose-dependente e irreversível, agregação esta inibida por uma pré-incubação da suspensão de plaquetas com SNP (500 μ M) ou Iloprost (100 nM). A crotoxina também induz a liberação de TXB₂ (207-8 ng/ml, n=6). Nossos resultados demonstram que a crotoxina induz a agregação de plaquetas humanas lavadas, independente da liberação de produtos de ciclo-oxigenase, assim como apresenta importante atividade coagulante.

INTRODUÇÃO

Plaquetas são células sanguíneas, com diâmetro de 2 - 3 μm , possuem forma lenticular quando não estimuladas e são formadas através da fragmentação de megacariócitos (Pennington, 1981). Através da invaginação da superfície dessas células, 3000 a 4000 plaquetas podem ser formadas a partir de cada megacariócito (White & Krivit, 1967.). As plaquetas são anucleadas mas apresentam organelas sub-celulares presentes em outras células, tais como mitocôndria, microtúbulos, grânulos, complexo de Golgi e ribossomos. As menores organelas presentes nas plaquetas são os grânulos secretores, os quais correspondem a aproximadamente 20% de seu conteúdo. Esses grânulos são diferenciados e denominados grânulos densos e α -grânulos; apesar de serem facilmente visíveis através da microscopia, a diferenciação entre os dois tipos de grânulos e a mitocôndria é de difícil visualização (Marcus, 1969; Zucker-Franklin, 1988.). Através de técnicas imuno-histoquímicas, foi possível localizar nos α -grânulos componentes como o fator 4, β -tromboglobulina, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator derivado de plaquetas e fator de von Willebrand (Sander *et al.*, 1983; Cramer *et al.*, 1985.).

Morfologicamente, existem três fatores que diferenciam a superfície da membrana de plaquetas à de outras células: a) apresentam uma espessa camada de proteoglicanos (duas vezes mais espessa do eritrócito); b) possuem a habilidade de formar pontes de fibrilas que permitem ligar as membranas de uma plaqueta à outra, promovendo concomitantemente uma agregação irreversível; c) são hábeis na distribuição de partículas intramembranas, característica essa que a diferencia de qualquer outro tipo de células de mamíferos (Zucker-Franklin, 1988.).

O papel fisiológico das plaquetas é dar início ao processo de homeostasia. Quando ocorre lesão endotelial, as plaquetas aderem ao sub-endotélio exposto (constituído principalmente de colágeno dos tipos I e IV, glicoproteínas e

microfibrilas) e deste modo, iniciam a ativação do processo homeostático. Esta ativação consiste, inicialmente, em uma mudança da forma discóide para a forma arredondada ("shape change"), seguida pela agregação e pela liberação de parte do conteúdo de seus grânulos, incluindo substâncias agregantes e inflamatórias, tais como adenosina difosfato (ADP; Born, 1962.), fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF; Niewiarowski, 1977; Kaplan, 1981.), tromboxano A₂ (Hamberg et al., 1975; Roth, 1986.) entre outras. Este processo inicia a formação do tampão hemostático no local lesado e fornece condições apropriadas para cessar o sangramento. Em casos patológicos, este mecanismo não ocorre, observando-se deficiências no processo de trombose.

As plaquetas apresentam receptores específicos para vários agonistas fisiológicos e a sua interação aos receptores promove diferentes respostas. São conhecidos oito diferentes tipos de respostas aos estímulos de plaquetas estudados *in vitro*: adesão, mudança de forma, agregação, secreção de grânulos densos e dos α -grânulos, liberação de ácido araquidônico, secreção de hidrolase ácida e retração do coágulo de fibrila.

A mudança de forma é a primeira resposta das plaquetas quando estimuladas através de agonistas solúveis e consiste em uma rápida transformação da forma discóide para a forma esférica com formação de pseudópodos, esta resposta não necessita de Ca⁺⁺ extracelular. Quando o Ca⁺⁺ extracelular e fibrinogênio estão presentes e as células são levadas a um contato com outras células, (como por exemplo, através da agitação de uma suspensão de plaquetas), ocorre uma agregação plaquetária. As plaquetas apresentam receptores para fibrinogênio, que são expostos somente quando ocorre a interação das plaquetas com agonistas. A ligação do fibrinogênio é aparentemente, independente da mudança de forma e requer Ca⁺⁺. O papel ativo das plaquetas para exercer a agregação induzida através dos agonistas, parece estar relacionado com a exposição do receptor para

fibrinogênio. A secreção dos grânulos densos e dos α -grânulos, que é a exocitose de seus conteúdos, ocorre simultaneamente e com uma relação dose-resposta similar.

A liberação de ácido araquidônico é uma resposta metabólica da hidrólise dos fosfolípídeos de membranas das plaquetas promovida por fosfolipases (PLA_2) e lipases, e é uma das características do processo de agregação.

A secreção da hidrolase ácida é considerada o processo de secreção mais lento e requer um alto nível de estimulação para ser desencadeado.

A superfície da membrana de plaquetas contém receptores para diferentes tipos de agonistas que são liberados, expostos, ou ainda, gerados em locais onde ocorre um trauma vascular. Esses agonistas se ligam as plaquetas e iniciam uma série de reações bioquímicas que levam a uma agregação plaquetária e a liberação do conteúdo de seus grânulos. Esses agonistas são classificados como fortes ou fracos, de acordo com sua capacidade em promover a liberação do conteúdo dos grânulos das plaquetas independente de que necessariamente ocorra a agregação plaquetária.

Os agonistas plaquetários considerados potentes são:

Trombina - A trombina é um fator coagulante (fator IIa), com importante papel na coagulação sanguínea na clivagem do fibrinogênio (fator I) para a formação da fibrina, que além de ser a base fibrilar do coágulo ativa outros fatores da coagulação (fator V, VIII e XIII). A trombina é formada durante o processo de coagulação por ação do fator Xa sobre o precursor plasmático, a protrombina, e é uma serina protease com peso molecular de 36000, e é o único fator coagulante que ativa plaquetas e que em concentrações fisiológicas promove agregação e secreção dos grânulos densos, α - grânulos e lisossomas (Hourani *et al.*, 1991). O papel fisiológico da trombina no processo de coagulação e na interação entre plaquetas e a cascata de coagulação não deixa dúvidas; trombina agrega plaquetas em concentrações

fisiológicas (Shuman *et al.*, 1976); entretanto, em pacientes que apresentam deficiência de fatores da coagulação, onde espera-se que ocorra uma deficiência na atividade da trombina, apresentam tempo de normal de sangramento, sugerindo que a trombina não é obrigatória na ativação hemostática de plaquetas, presumindo-se que existam outros mecanismos para ativação de plaquetas (Macfarlane *et al.*, 1975). A trombina é considerada o mais potente agonista da agregação plaquetária, promove uma mudança de forma e agregação, inibindo os níveis de concentração de AMPc.

Colágeno - Existem oito tipos de colágenos geneticamente distintos, entretanto, não são todos que reagem com plaquetas. Os colágenos intersticiais do tipo I e III, são os mais abundantes nas membranas e o do tipo IV se aderem as plaquetas, em contraste, o colágeno cartilaginoso, tipo II e tipo V, não interagem com plaquetas (Santoro *et al.*, 1986). A interação das plaquetas com colágenos é, certamente, mais complexa que uma simples interação com o receptor, no entanto, seu papel fisiológico e patológico merece ser estudado, pois, é um importante ativador plaquetário e desempenha um papel fundamental no processo de homeostasia. Sabe-se que o colágeno promove "shape change", agregação e secreção porém são processos secundários a indução da reação de liberação, uma vez que o colágeno se liga a muitos agentes que são capazes de induzir a agregação plaquetária, e que podem ainda liberar ADP dos grânulos densos das plaquetas (Huang *et al.*, 1980). A ativação de plaquetas por colágeno requer ADP e síntese de prostaglandinas (Kinlough-Rathbone *et al.*, 1976), isto sugere que o ADP é essencial para a agregação e a ligação do fibrinogênio estimulado por colágeno, sabe-se ainda, que a quantidade de prostaglandina formada por estimulação com colágeno é insuficiente para causar um "shape change" na ausência de ADP, sugerindo que existe uma interdependência de ADP e síntese de prostaglandinas na ação do

colágeno sobre as plaquetas (Colman *et al.*, 1988).

Agonistas Plaquetários Fracos:

Adenosina 5'-Difosfato - O ADP foi o primeiro composto descrito capaz de induzir agregação de plaquetas *in vitro* (Born, 1962), causando uma mudança de forma de plaquetas, seguido da agregação e liberação do conteúdo de seus grânulos. Entretanto, esta liberação somente é observada em meios que apresentam níveis reduzidos de Ca^{++} e é consequência da síntese de tromboxano A_2 (Mustard *et al.*, 1975). Uma outra atividade observada (Cole *et al.*, 1971) é de que o ADP antagoniza a estimulação de adenilato ciclase através da PGE_1 ; a ação dessas enzimas é de converter ATP em AMPc o qual inibe a mudança de forma das plaquetas, adesão, agregação e a liberação do conteúdo de seus grânulos.

Sabe-se que em algumas patologias, onde o indivíduo apresenta uma diminuição na quantidade de plaquetas armazenadas, e que necessita de ADP no interior de seus grânulos tem uma tendência muito acentuada à sofrer processos hemorrágicos. Esta tendência implica que a liberação de ADP de plaquetas afeta a hemostasia e por analogia, os processos de trombooses. Em vista disso, os antagonistas de receptores de ADP podem ser usados como ferramentas clínicas no tratamento desta patologia (Hardisty *et al.*, 1967).

Adrenalina - O efeito estimulatório da adrenalina sobre plaquetas humanas foi descoberto por O'Brien (1963), demonstrando que a indução da agregação plaquetária era precedida de uma mudança de forma, e que a adrenalina era a responsável por este evento. A agregação induzida pela adrenalina não ocorre em todas as espécies animais e por este motivo é considerada espécie-dependente; as plaquetas de alguns mamíferos como os ratos, cobaios, coelhos e cães, não são sensíveis à adrenalina. Interessante notar que a adrenalina, em humanos, potencia a

agregação induzida por outros agonistas, tais como o ADP (Dodds, 1978; Kerry *et al.*, 1985). Em humanos, observa-se que a resposta à adrenalina é variável de indivíduo para indivíduo. Alguns indivíduos apresentam plaquetas não responsivas a adrenalina na agregação, entretanto, respondem normalmente a outros agentes agregantes (Jakobs *et al.*, 1987). A resposta observada para a adrenalina parece ser dependente da quantidade de α -adrenoceptores estimulatórios presentes, bem como, da razão destes receptores para os β -adrenoceptores inibitórios, também presentes nas plaquetas (Kerry *et al.*, 1984). Os α -receptores presentes nas plaquetas, foram caracterizados farmacologicamente como sendo do tipo receptor α_2 , o qual permite o acesso das catecolaminas no sangue e inibe a ação do adenilato ciclase (Kerry *et al.*, 1985). Não foi ainda definido qual a implicação fisiopatológica em indivíduos que possuem uma quantidade menor de receptores do tipo α_2 , e portanto não respondem à adrenalina, comparando-os com aqueles que respondem a mesma.

Serotonina - Rapport *et al.* (1948) demonstraram que uma substância vasoconstritora, a serotonina, estava presente no soro humano. Mais tarde, Rand *et al.* (1951), demonstraram que a serotonina é encontrada nas plaquetas e são liberadas durante o processo de coagulação, sendo esta liberação causada pela trombina. Estudando plaquetas lavadas de porco, Grette (1962) demonstra que além da serotonina, também ocorre liberação de nucleotídeos tais como a adenina, fosfato inorgânico, ácidos graxos livres e pequenas quantidades de proteínas celulares. Seus resultados indicam que este processo difere da lise celular e é, portanto, uma reação de liberação seletiva.

Algumas espécies possuem plaquetas ricas em serotonina, como o coelho por exemplo, e estas plaquetas contém um número maior de grânulos densos, enquanto que em outras espécies, como por exemplo a humana, apresentam plaquetas pobres em serotonina. A agregação plaquetária induzida pela serotonina foi observada

primeiramente por Mitchell *et al.* (1964). Em plasma humano citratado, rico em plaquetas a agregação é precedida por uma mudança de forma das plaquetas e é geralmente fraca e reversível. A serotonina induz agregação plaquetária em concentração entre 0.2-10 μmol , enquanto que, em concentrações maiores apresentam um menor efeito agregante. O papel da serotonina na homeostasia humana não foi ainda definido, entretanto, a sua liberação das plaquetas pode contribuir em outros eventos como a enxaqueca e a tromboembolia.

Fator Ativador de Plaquetas - O fator ativador de plaquetas (PAF) foi inicialmente verificado em leucócitos, e posteriormente considerado um potente ativador da agregação plaquetária em concentrações de 10^{-8} - 10^{-9} M (Benveniste *et al.*, 1972). A estimulação de PLA₂ de plaquetas por agentes como colágeno, trombina e ionóforo de Ca⁺⁺ A23187, promove a liberação de um precursor do PAF, o 2-liso-PAF aceter, dos fosfolipídeos derivados da fosfatidilcolina de membranas plaquetárias. Este sofre uma acetilação pela acetil-transferase, dando origem ao PAF, ou mais corretamente, o PAF-aceter (1-O-alkil, 2-acetil gliceril 3 - fosforil colina). Inibidores da PLA₂ como a dexametasona, diminuem a formação do PAF-aceter (Parente *et al.*, 1985). Em plasma humano citratado, o PAF-aceter produz uma agregação bifásica, similar ao ADP e adrenalina; a segunda fase envolve a liberação de TXA₂, e pode ser inibida através do uso de indometacina ou aspirina. Em plaquetas humanas lavadas, o PAF-aceter não só promove a mobilização de Ca⁺⁺ intracelular, como ainda, media o influxo de Ca⁺⁺ extracelular.

Metabólitos do ácido araquidônico (AA) - Em 1973, Vargaftig & Zirins; Willis & Kuhn, demonstraram que o AA era capaz de agregar plaquetas. A evidência inicial da interação entre plaquetas e os metabólitos do AA foi provada em 1970, quando Smith & Willis mostraram que plaquetas estimuladas com trombina produziam

prostaglandinas (PG) E₂ e (PG) F₂. Em seguida, foi demonstrado que drogas anti-inflamatórias não esteroidais, como a indometacina e aspirina, inibiam a formação das prostaglandinas (Vane, 1971), confirmando que o AA era o precursor das prostaglandinas e de sua atividade biológica (Vargaftig & Dao, 1971, 1972), mais tarde identificado como tromboxano A₂ (TxA₂) por Hamberg *et al.* (1975).

O ácido araquidônico é metabolizado nas plaquetas por duas enzimas: a ciclo-oxigenase e a 12-lipoxigenase. A ciclo-oxigenase metaboliza o AA em endoperóxidos cíclicos, conhecidos como prostaglandinas G₂ e H₂ (PGG₂ e PGH₂). Estes endoperóxidos sofrem a ação na plaqueta da tromboxano sintetase, responsável pela síntese de tromboxano A₂ (Hamberg *et al.*, 1975). Tanto os endoperóxidos cíclicos como o tromboxano A₂ causam agregação plaquetária, assim como vasoconstrição (Hamberg *et al.*, 1975 a; Needleman *et al.*, 1976.). Acredita-se que os endoperóxidos cíclicos atuam na plaqueta no mesmo receptor que o tromboxano A₂, suposição esta, que explicaria a ausência de efeito clínico dos inibidores da tromboxano sintetase (Needleman *et al.*, 1977.), como os derivados do imidazol, nos processos de regulação da trombose. Atualmente estão em estudos clínicos os antagonistas do tromboxano A₂, visto que estes fármacos previniriam também o efeito dos endoperóxidos cíclicos nas plaquetas e na musculatura lisa vascular.

Esta via metabólica do ácido araquidônico exerce um papel importante na modulação da atividade plaquetária *in vivo*. Há varios ensaios clínicos (Steering, 1989), demonstrando o efeito benéfico da administração de baixas doses de ácido acetil-salicílico (AAS) na prevenção do infarto do miocárdio. É importante ressaltar que o AAS é um inibidor irreversível da ciclo-oxigenase (Vane, 1971; Vargaftig & Dao, 1971) e em virtude da plaqueta não possuir núcleo, e conseqüentemente não apresentar atividade de síntese proteica, a inibição desta enzima na plaqueta causa inibição irreversível da síntese dos endoperóxidos e do tromboxano A₂.

Através da enzima 12-lipoxigenase, as plaquetas transformam o AA em 12-hidroperóxido-eicosatetranoico (12-HPETE), o qual é subsequentemente transformado enzimaticamente em ácido-hidroieicosatetranoico (12-HETE; Siegel *et al.* 1979 a). Drogas do tipo aspirina, as quais bloqueiam totalmente a cicloxigenase, promovem um aumento de duas a três vezes na produção de HETE de plaquetas (Siegal *et al.* 1979 b). O papel fisiológico desta via não foi ainda bem definido.

A regulação da produção de metabólitos do ácido araquidônico é feita através de dois principais mecanismos: disponibilidade do substrato e ativação da enzima. A disponibilidade do substrato é a limitante primordial no controle da síntese dos derivados da ciclo-oxigenase, visto esta enzima não necessitar de ativação, ao contrário do que ocorre com as lipoxigenases de um modo geral (Bach, 1984.). A liberação do ácido araquidônico depende essencialmente da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). É interessante notar que a fosfolipase A₂ de plaquetas possui características distintas das demais fosfolipases A₂ celulares, visto não ser inibida por glicocorticóides.

Inibidores da Ativação plaquetária

GMP cíclico - O GMP cíclico é um importante segundo mensageiro em várias células incluindo tecido vascular liso, no qual a elevação de GMP cíclico por agonistas dependentes de endotélio (acetilcolina, substância P) ou nitrovasodilatadores (nitroprussiato de sódio) causa relaxamento, provavelmente através da ativação da GMPc quinase e consequente fosforilação da cadeia leve de miosina do músculo liso. As plaquetas tem a capacidade de sintetizar GMPc em resposta a certos estímulos e possui um nível alto de guanilato ciclase solúvel, de fosfodiesterase de GMPc e de proteína quinase dependente de GMPc. Os níveis de GMPc estão elevados em resposta a agonistas como a ADP, serotonina, colágeno e ácido araquidônico, sugerindo que um aumento de GMPc está envolvido na ativação

plaquetária. O aumento de GMPc é provavelmente a consequência da ativação plaquetária, e não a sua causa, visto que aumento de GMPc por nitrovasodilatadores (como o nitroprussiato de sódio) causa inibição da agregação plaquetária. O fato de ocorrer elevação de GMPc quando a plaqueta é ativada, provavelmente reflete um mecanismo de "feedback" negativo, que permite deste modo modular a resposta plaquetária. O GMP cíclico é metabolizado nas plaquetas pelas fosfodiesterases.

AMP cíclico - A elevação nos níveis de AMPc nas plaquetas, levam a uma inibição na sua ativação (Mills, 1982). O AMPc é formado através da ação de agonistas da estimulação de adenilato ciclase e removido por fosfodiesterases AMPc até que os níveis intracelulares apresentem um equilíbrio na concentração. Os agentes que são capazes de estimular adenilato ciclase ou inibir a atividade das fosfodiesterases, levam a um aumento no equilíbrio de AMPc e são potencialmente agentes anti-trombóticos. As prostaglandinas e seus análogos estáveis são potentes estimuladores de adenilato ciclase de plaquetas e também, potentes inibidores da ativação plaquetária. Os inibidores das fosfodiesterases também agem sinergicamente com os agentes que induzem um aumento nos níveis de AMPc inibindo a agregação plaquetária. A atividade das fosfodiesterases pode ser inibida por compostos como: dipiridamol, isobutil-metil xantina e papaverina, compostos estes que também inibem a agregação plaquetária (Turpie & Hirsh, 1978). Dentre as prostaglandinas que estimulam adenilato ciclase de plaquetas, incluem-se PGE₁, PGE₂ e PGI₂ (prostaciclina). Prostaciclina é o mais potente inibidor da agregação plaquetária e de maior importância fisiológica por ser sintetizada por células endoteliais (McIntyre, 1981). A adenilato ciclase de plaquetas e de membranas de plaquetas, é inibido por vários agentes, entre eles: trombina, ADP e epinefrina os quais agem através de interação com os receptores de adenilato ciclase, estes agentes são todos ativadores de respostas plaquetárias como shape change e agregação (Mills, 1982).

Conforme visto acima, a PLA₂ possui papel fundamental na ativação plaquetária, quer seja através da liberação de ácido araquidônico, e conseqüentemente de seus metabólitos, quer através da liberação de liso-PAF. Abaixo revisamos algumas das características fundamentais deste importante grupo de enzimas.

Fosfolipase A₂ - As Fosfolipases A₂ (PLA₂), também conhecidas por fosfatidil-acil-hidrolases (EC 3.1.1.4), são enzimas lipolíticas que agem especificamente na catálise da hidrólise da ligação éster na posição 2-acil (Sn-2) dos L-fosfolípídeos, que são considerados substratos igualmente adequados para os processos hidrolíticos catalisados pelas demais fosfolipases (Figura 1; Slotboom, 1982; Hanahan, 1971). A reação hidrolítica catalisada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípídeos.

A PLA₂ é considerada como modelo nos processos catalíticos que se desenvolvem na interface lipídeo/água, pois atua preferencialmente em substratos agregados como micelas, bicamadas ou lipoproteínas. Isto explica a ampla distribuição das PLA₂ no reino animal, com presença demonstrada quer em organelas sub-celulares como em compartimentos extracelulares, bem como a sua participação em inúmeros fenômenos fisiopatológicos e/ou fisiológicos.

Dentre os fenômenos fisiológicos, merece ser citado o processo de absorção na luz intestinal, o qual requer uma hidrólise prévia desses agentes catalisada por uma PLA₂ secretada pelo pâncreas de mamíferos (Lee & Ho, 1978). Analisadas em conjunto, as PLA₂ são consideradas uma família de proteínas de peso molecular relativamente baixo, variando entre 12,000 e 15,000, contendo um número elevado de pontes dissulfeto e que apresentam considerável resistência aos detergentes, as variações de pH e as altas temperaturas, além de revelarem uma razoável homologia entre si, em termos de sequência de aminoácidos, exceto a da PLA₂ do veneno de abelha que se diferencia por ser uma glicoproteína (Chang, 1987). A grande

homologia entre as PLA₂(s) secretadas pelo pâncreas de mamíferos, com as correspondentes enzimas presentes nos venenos ofídicos pertencentes às famílias **Hidrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae** (Figura 2), estimulou a realização de estudos referentes ao isolamento destas últimas, a fim de usá-las como possíveis instrumentos de análise farmacológica para a avaliação do papel biológico desempenhado pelas PLA₂(s) no organismo animal em geral e particularmente, nos mamíferos e na espécie humana (Vadas, 1986).

As PLA₂ encontradas em certos ofídios são secretadas por glândulas que se desenvolveram a partir de órgãos digestivos de serpentes e além da função digestiva, apresenta uma função defensiva, de maneira a permitir ao réptil paralisar a presa e deste modo, alimentar-se (Verheij, 1981). Dentre outras funções da fosfolipase, destaca-se a que aborda o seu eventual papel no desencadeamento dos processos metabólicos que envolvem os fosfolipídeos das bicamadas presentes em membranas biológicas, incluindo as plasmáticas e a das organelas sub-celulares, estas últimas envolvendo os lisossomos, as mitocôndrias, retículos sarcoplasmáticos etc. (Kunze, 1971; Haye, 1973; Flower, 1976). A avaliação deste papel, somente tornou-se possível, ao serem dados nestas últimas décadas, passos importantes na elucidação das estruturas químicas (moleculares) de várias PLA₂, oriundas de diferentes espécies animais, incluindo aquelas encontradas em venenos de serpentes e de abelhas e, obviamente, as isoladas de diferentes tecidos de mamíferos.

Dentre as PLA₂(s) assinaladas na Figura 2, as mais estudadas para essa finalidade são as que, em natureza, estão acopladas a outras sub-unidades formando complexos proteicos, como ocorre com a β -bungarotoxina, taipoxina, caudoxina e a crotoxina.

Desde 1966 a fosfolipase A foi considerada um fator determinante para a formação de prostaglandina (PG) (Vogt *et al.*, 1966). De fato, em um sistema de perfusão de pulmão de cobaias com fosfolipase A₂, proveniente de veneno, detectou-se grande quantidade de PG no perfusato (Vogt *et al.*, 1969). De fato, a presença de PLA₂ em plaquetas foi amplamente confirmada (Apitz-Castro, 1981; Lagarde, 1981). Devido ao seu papel chave no metabolismo do AA, a PLA₂ é o sítio potencial de ação para modular a formação de eicosanoides.

A mepacrina foi o primeiro agente farmacológico capaz de inibir PLA₂ (Vargaftig & Dao, 1972); posteriormente, um inibidor mais específico de PLA₂, o brometo de p-bromofenacil, demonstrou ser eficiente inibidor de hidrólise de fosfolípídeos na ativação plaquetária. Os corticosteróides também inibem a atividade de PLA₂, através do bloqueio na liberação de AA, enquanto a conversão de AA exógeno é mantida (Blackwell *et al.*, 1982).

RELAÇÃO ENTRE FOSFOLIPASES A₂ ISOLADAS DE VENENOS E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂), isoladas a partir de venenos de serpentes, demonstram ter diferentes atividades biológicas sobre plaquetas. De fato, foram descritos diferentes tipos de PLA₂, provenientes de fontes diversas, que podem iniciar, potencializar ou ainda inibir a agregação plaquetária (Kini & Evans, 1989.).

A fosfolipase A₂, isolada do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus*, induz a agregação plaquetária (Ouyang *et al.*, 1979), enquanto que àquelas provenientes dos venenos de *Vipera russelli* (Iatridis *et al.*, 1976) e *Naja nigricollis crawshawii* (Kini *et al.*, 1988), inibem a agregação plaquetária induzida por trombina.

Existe ainda um outro tipo de atividade biológica das fosfolipases A₂ sobre plaquetas, denominado efeito bifásico, pois podem induzir a agregação de plaquetas em doses baixas e inibir em doses mais altas, como ocorre com a PLA₂ isolada a partir do veneno da abelha, *Apis mellifera* (Shipoloni *et al.*, 1974) e da serpente *Naja naja atra* (Ouyang *et al.*, 1984).

Foi demonstrado que a agregação induzida por proteínas com atividade enzimática tipo fosfolipase A₂ é completamente inibida pela indometacina, indicando que a agregação ocorre via ativação de ácido araquidônico, além do que essas enzimas induzem a formação de tromboxano B₂ de modo dose-dependente (Smith *et al.*, 1991).

No veneno de *Crotalus durissus terrificus* a fração convulxina (Prado-Franceschi, 1981), foi descrita como sendo a responsável pela indução da agregação plaquetária (Vargaftig, 1980; Prado-Franceschi, 1981). Em 1982, Bon verificou que a crotoxina, principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a qual contém fosfolipase A₂ como uma de suas sub-unidades, não apresentava nenhuma atividade biológica sobre plaquetas de coelhos.

A crotoxina, considerada a principal toxina presente no veneno da *Crotalus durissus terrificus*, (cascavél sul-americana), foi isolada e obtida sob a forma cristalizada, inicialmente por Slotta e Fraenckel-Conrat (1938). Posteriormente, demonstrou-se que a crotoxina tratava-se de um complexo proteico resultante da interação quaternária de duas sub-unidades representadas por uma proteína ácida, de peso molecular 9000, denominada **Crotapotina** e de um componente básico de peso molecular 12000, denominado **Fosfolipase A₂**, que é responsável tanto pela atividade enzimática bem como, pela toxicidade induzida pelo complexo (Hendon, 1971).

Embora a crotapotina seja considerada farmacologicamente inativa, ela parece facilitar a atividade da PLA₂ ao ocupar sítios de fixação inespecíficos dessa enzima a nível de membranas biológicas, propiciando, dessa forma, a interação da PLA₂ em locais específicos para o desencadeamento das atividades biológicas em terminais nervosos motores somáticos (Bonn *et al.*, 1979). Dentre os efeitos farmacológicos induzidos pela crotoxina, mereceram particular atenção os que envolveram o estudo dos mecanismos responsáveis pelo bloqueio neuromuscular (Brazil, 1966) e pela queda de pressão arterial, que constituem fatores relevantes no envenenamento induzido pelas peçonhas que contém PLA₂ como componente principal.

Os aspectos correlacionados com a junção neuromuscular evidenciaram ações da enzima a nível pré-sináptico possibilitando a sua caracterização farmacológica do tipo **neurotoxina**, cujas propriedades são muito semelhantes à β -bungarotoxina, fato que possibilitou o seu largo emprego como instrumento de análise farmacológica, porém sem maiores repercussões em termos de um eventual emprego terapêutico. A crotoxina possui ainda atividades hemolítica (Rosenfeld, 1971) e miotóxica sistêmica, caracterizada pela liberação de mioglobina detectada em pacientes acidentados (Azevedo-Marques, 1982; Cupo, 1988). No homem, o comprometimento renal como consequência do envenenamento crotálico, pode levar o indivíduo a desenvolver uma insuficiência renal aguda com necrose tubular (Amaral, 1985; 1986).

OBJETIVO

O objetivo desta tese foi investigar o efeito na agregação plaquetária de crotoxina obtida através de uma modificação do método descrito por Slotta & Fraenkel-Conrat (1938), assim como de suas sub-unidades crotapotina e fosfolipase A₂.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DA CROTOXINA PURIFICADA - A crotoxina purificada foi obtida a partir de 100 mg do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*, dissolvidos em 2.0 ml de tampão Bicarbonato de Amônio (0.1 M, pH 8.0), clarificado por centrifugação a 2.000 rpm durante 15 minutos. O veneno dissolvido e solubilizado foi aplicado em uma coluna de vidro medindo 1.6 x 100 cm, empacotada com Sephadex G-75, previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio (0.1 M, pH 8.0) As frações resultantes foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio e coletadas com fluxo constante de 9 ml/hora, recolhendo-se 3 ml/tubo em coletor Gilson (modelo VL). Os picos foram selecionadas e identificadas através de leitura da absorbância, em espectrofotômetro Beckman (modelo 25) à 280 nm.

OBTENÇÃO DA PLA₂ E DA CROTAPOTINA - A obtenção da PLA₂ e da crotapotina foi realizada partindo-se de 100 mg de crotoxina pura, dissolvidos em 2.0 ml de tampão formiato de amônio (0.15 M, pH 3.5). A crotoxina solubilizada, foi aplicada em uma coluna de vidro medindo 1.8 x 23 cm, empacotada com SP Sephadex C-25 e equilibrada com o tampão inicial. A eluição foi processada em dois degraus empregando-se o tampão inicial 0.15 M e 2.5 M em NaCl com fluxo de eluição de 12 ml/h. Foram coletados 3 ml/tubo. As frações foram identificadas por leitura à 280 nm em espectrofotômetro Beckman (modelo 25).

ENSAIO ENZIMÁTICO - A atividade enzimática da PLA₂ foi determinada segundo método preconizado por Breithaupt (1976). Este método, consiste na titulação volumétrica da hidrólise enzimática da PLA₂, utilizando-se como substrato uma dispersão aquosa contendo lipoproteínas da gema de ovo, (3 mM) de Deoxicolato de Sódio e (6 mM) de Cloreto de Cálcio bi-hidratado , com ordem cinética

zero. A atividade ótima é obtida mantendo-se a temperatura entre 53-57 °C, pH 7-8. A titulação foi realizada utilizando-se (0.1 N) de Hidróxido de Sódio. Através do método são determinados os valores de unidade enzimática e atividade específica por mg de enzima.

ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA-TRICINA - Utilizamos o método descrito por Shager & Jagow (1987). Foi utilizado um sistema Might Small II SE 250 (géis 16 x 10 cm), acoplado a um banho de circulação refrigerada RCB-300. A partir de uma solução estoque de acrilamida 46.5% (P/V) e bisacrilamida 3% (P/V), foram obtidos géis de separação de 16.5%, sobrepostos por uma camada de gel (2 cm) à 10% e um gel de concentração à 4%. Foram utilizados dois tampões de corrida; o tampão anódico (0.2 M pH 8.9) Tris-HCl e o tampão catódico (0.1 M) Tris, (0.1 M) Tricina, (0.1%) SDS. As amostras entre 20-50 µg foram dissolvidas em 20 µl de tampão Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0.001% de azul de bromofenol. O gel foi corado em prata segundo método descrito por Merril *et al.*(1984). Coloração do Gel: O gel foi fixado em 40% de metanol e 10% de ácido acético (V/V), durante 30 minutos e posteriormente foi fixado utilizando-se uma mistura contendo 10% de etanol e 5% de ácido acético (V/V) durante 15 minutos. Após a fixação o gel foi oxidado durante 3 minutos com dicromato de potássio (3.4 mM) e lavado com água deionizada. A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata (12 mM) durante 15 minutos, lavado em água deionizada e posteriormente revelado com carbonato de sódio (0.28 M) durante aproximadamente 15 segundos. Para bloquear a reação, foi utilizado 5% de ácido acético (V/V) durante 5 minutos.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO DESEMPENHO - Utilizamos para a purificação da crotocina, PLA₂ e crotapotina, equipamento Waters HPLC (modelo ALC/GPC-204), equipado com duas bombas Waters (modelo 6000) com detector ultra violeta (Waters 440). Utilizamos um injetor automático de amostra Waters (modelo.UK) e coluna C₁₈ μ Bondapack (0.39 x 30cm). A fase móvel era constituída de metanol/acetonitrila 99%. A cromatografia reversa foi realizada, com um gradiente linear de 0 a 66% de acetonitrila em 0.05% de ácido acético pH 2.5. As amostras aplicadas foram monitoradas à 210nm.

SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS - O sequenciador automático de proteínas e peptídeos, utiliza a técnica de degradação de Edman (Edman,1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após ativação de um filtro, composto de papel e fibra de vidro, a proteína é hidrofobicamente unida a este suporte, que em seguida, é colocado na câmara de reação . Após cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica sob a forma derivada de anilintiazolinona (ATZ). O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão, onde a identificação é realizada em comparação à cromatografia de uma mistura padrão de PTH aminoácidos. O sequenciador utilizado (modelo 477A), utiliza para a identificação dos PTH aminoácidos, um sistema de HPLC (modelo 120A), ambos da Applied Biosystem . Os reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo sequências automáticas de alta sensibilidade (10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos).

Os reagentes utilizados são: R1 [5% fenilisocianato (PITC) em n-heptano]; R2 [12.5% trimetillamina (TMA) em água]; R3 [ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002% de DTT]; R4 [25% TFA em água com 0.01 DTT]; R5 [acetonitrila, com 0.001% DTT] S1 [n-hepteno]; S2 [etilacetato]; S3 [1-clorobutano]; S4 [20% acetonitrila em água].

a. Ativação do filtro - Um filtro de fibra de vidro, previamente tratado com BioBrene, é ativado na câmara de reação do sequenciador, programado à realizar dois ciclos de reação, para a completa ativação e eliminação do excesso de reagentes, que, poderiam interferir durante as etapas de degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, ficará imobilizada e pronta para iniciar o sequenciamento. A capacidade mínima do filtro, é cerca de 30 µl e, se necessário, aplica-se maior volume. Seca-se o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

b. Ciclo de reação - As etapas de degradação de Edman, denominadas acoplamento, consiste na união do PITC com o aminoácido da cadeia polipeptídica e, a etapa de clivagem, na formação do ATZ aminoácido. Este processo ocorre na câmara de reação, que consiste de dois blocos de vidro, acoplado internamente de uma pequena câmara com o filtro ativado. Todas as etapas de reação ocorrem no ciclo chamado Normal-1, cujo período de duração é de 43 min.e 32 seg. O reagente R2 (TMA) proporciona o pH básico (9 - 9.5) para que o PITC se acople ao aminoácido N-terminal do peptídeo. R3, que consiste de TFA, usado para clivar o aminoácido unido ao PITC do resto da cadeia polipeptídica, produzindo o derivado anilintiazolinona (ATZ) do aminoácido. Após a etapa de clivagem, a proteína é deixada com um novo amino terminal pronto para o próximo ciclo de degradação.

c. Ciclo de conversão - Nesta etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é transferido da câmara de reação, através do solvente S3 para a câmara de conversão. O ATZ é um derivado instável, sendo desejável sua conversão para um isômero mais estável que é a feniltioidantoína do correspondente aminoácido . A câmara de conversão é equipada com um tubo cônico, cujo volume interno é de 1 ml,

para onde são enviados os reagentes necessários para o ciclo de conversão, mantido a temperatura constante de 62°C, com um período de duração de 44 min. e 1 seg.

d. Identificação dos PTH aminoácidos - Após completado o ciclo de conversão, uma alíquota do PTH aminoácido é transferida para o coletor de frações e para confirmar a presença de PTH-S-CMCYs (feniltioidantoína-S-carboximetil cisteína), o restante da amostra é imediatamente aplicado em HPLC para identificação dos aminoácidos. A comparação é feita, através de uma análise padrão de PTH aminoácidos.

ESTUDO DE HOMOLOGIA SEQUENCIAL - O estudo da homologia sequencial foi feito através do banco de dados PIR (Protein Identification Resource).

TESTE DE TOXICIDADE DA CROTOXINA - DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL₅₀ EM CAMUNDONGOS - Camundongos Swiss (18 - 20 g, ambos sexos), foram inoculados por via intravenosa, com 0.1 ml de crotoxina dissolvida em solução fisiológica tamponada, pH 7.4 em 4 doses com intervalos de 1.5. Foram utilizados 6 animais/dose. A DL₅₀ foi determinada após um intervalo de 24 horas e os cálculos foram determinados segundo método descrito por Weil (1952).

PREPARAÇÃO DE PLAQUETAS LAVADAS - As amostras de sangue de pacientes voluntários, que não tinham feito uso de qualquer tipo de medicação nos quinze dias que precederam a coleta, foram coletados através de punção venosa em tubos plásticos contendo 3.8% de citrato de sódio. Plasma rico em plaquetas foi preparado por centrifugação a 900 G por 8 minutos a temperatura ambiente em presença de iloprost (0.8 µM) . O sobrenadante foi removido e as plaquetas foram ressuspensas em 15 ml de tampão Krebs' isento de cálcio e oxigenado com uma

mistura de 95% O₂/5% CO₂. O Iloprost (0.8 μM) foi novamente adicionado e as plaquetas foram centrifugadas a 900 G durante 8 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspensas novamente em solução de Krebs (Radomski & Moncada, 1983). A contagem de plaquetas foi determinada automaticamente (Coulter Counter modelo T 890, Hialeah, Fla., EUA) e ajustadas para 1 x 10⁸ células/ml. À suspensão final de plaquetas foram adicionados 10 μM de Indometacina e 1 mM de cálcio.

MEDIDA DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA - A suspensão de plaquetas lavadas (500 μl) foi incubada a 37⁰ C durante 1 minuto em um agregômetro (Payton) de dois canais (Born & Cross, 1963) com agitação contínua a 900 rpm e então estimuladas com trombina (200 mU/ml), crotoxina (15 - 50 μg/ml), fosfolipase A₂ (50 μg/ml) ou crotapotina (50 μg/ml). As mudanças de densidade ótica (DO) foram medidas durante 5 minutos após estimulação. A inibição da agregação plaquetária foi feita através de uma pré-incubação das plaquetas lavadas com iloprost (8 - 80 nM) ou com nitroprussiato de sódio (50 - 500 μM) por 1 minuto antes da estimulação com trombina (200 mU/ml) ou crotoxina (50 μg/ml).

DOSAGEM DE TROMBOXANO A₂ LIBERADO DAS PLAQUETAS - Para a dosagem de tromboxano liberado, as amostras agregadas com crotoxina (50 μg/ml) ou trombina (200 mU/ml), foram centrifugadas durante 3 minutos em uma microcentrifuga Beckman e o sobrenadante foi então removido e estocado a -20⁰ C . O procedimento utilizado para a determinação dos níveis de TXA₂ através de radioimunoensaio utilizando [³H] TXB₂ e a especificidade do anti-soro usado foi àquele descrito por Salmon, (1978). Para o estudo de liberação de TXA₂, as plaquetas não foram incubadas com indometacina conforme descrito acima.

OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS - Sangue humano de voluntários sadios, que não fizeram uso de drogas nos 15 dias que antecederam a coleta, foi recolhido em tubo contendo citrato tri-sódico 3.8% (9:1 v/v) . O plasma rico em plaquetas (PRP), foi obtido após centrifugação do sangue à 200 G em temperatura ambiente, durante 15 minutos.

DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO - Utilizamos plasma rico em plaquetas, obtido como descrito acima; 20 μ l de crotoxina (1 mg/ml) foram adicionados a um tubo contendo 1.5 ml de PRP, mantido em um banho à 37⁰ C e o cronômetro foi imediatamente acionado. Por meio de inclinação cuidadosa do tubo, observou-se a cada 30 segundos, até que o plasma deixasse de fluir, acionando-se novamente o cronômetro determinando, desta forma, o tempo de coagulação . Utilizamos duas amostras de crotoxina, nas mesmas concentrações, porém, obtidas através de metodologias diferentes: uma através do fracionamento eluído com tampão bicarbonato de amônio (0.1 M pH 8.0) e a outra obtida através do fracionamento eluído com tampão formiato de amônio (0.1 M pH 3.5). A PLA2 (40 μ g) e crotapotina (40 μ g) isoladas a partir da crotoxina, também foram testadas. As crotoxinas eluídas com tampão formiato de amônio foram gentilmente cedidas pelos Professores J R Giglio (Departamento de Bioquímica, FMRP-USP) e C Bon (Instituto Pasteur, França).

RESULTADOS

ISOLAMENTO DA CROTOXINA EM SEPHADEX G-75 - Através da metodologia utilizada para o isolamento da crotoxina a partir do veneno total (100 mg) de *Crotalus durissus terrificus*, obtivemos três picos principais, sendo o pico III correspondente à fração crotoxínica. O conteúdo dos tubos correspondentes à crotoxina foi selecionado, agrupado (DO > 2.0) e posteriormente liofilizado, conforme indicado na Figura 3.

ISOLAMENTO DA PLA₂ E DA CROTAPOTINA EM SP-SEPHADEX C-25 - A recromatografia da crotoxina, empregando-se uma coluna de troca iônica, resultou em dois picos, sendo o pico III SP 1 correspondente a crotapotina, o pico III SP 2 correspondente a fosfolipase A₂. O conteúdo dos tubos correspondentes aos picos obtidos, foi selecionado, agrupado (DO > 2.0) e liofilizado após ser dialisado. A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico e as mudanças de concentração molar do tampão.

DOSE LETAL 50 DA CROTOXINA - A determinação da DL₅₀ da crotoxina forneceu um valor de 49 mg/kg (48-50 mg/kg; N= 8). Na tabela I nossos dados de DL₅₀ são comparados com os dados da literatura.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CROTOXINA E FOSFOLIPASE A₂ - A atividade específica da fosfolipase A₂ obtida, foi de 176 unidades por mg de substrato.

ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA-TRICINA - A eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida-Tricina, da fração crotoxínica obtida por

cromatografia de troca iônica apresenta duas bandas que correspondem respectivamente à fosfolipase A₂ e crotapotina (Figura 5).

SEQUÊNCIA N-TERMINAL DA PLA₂ - A sequência N-terminal dos vinte primeiros aminoácidos obtida foi:

1	10	20																		
H	L	L	Q	O	F	N	K	M	I	K	F	E	T	R	K	N	A	I	P	F

A sequência obtida foi igual àquela descrita por Aird (1986).

CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC) - Utilizamos a cromatografia de fase reversa para comprovarmos o grau de pureza das frações obtidas anteriormente por gel filtração. A crotoxina se desdobrou em dois picos (I e II), correspondentes respectivamente à crotapotina e fosfolipase A₂. A crotapotina e a PLA₂ quando aplicadas isoladamente, resultaram em um único componente (I e II), conforme ilustra as Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS INDUZIDA POR CROTOXINA - A capacidade da Trombina (200 mU/ml) de induzir agregação de plaquetas humanas lavadas demonstrou-se máxima (100%) e irreversível após 5 minutos. A Crotoxina (15 - 50 µg/ml) produz uma agregação plaquetária dose-dependente e irreversível após 5 minutos (Figura 9). Crotapotina não induz agregação plaquetária. Fosfolipase A₂ (50 µg/ml), isolada a partir da Crotoxina, mostrou-se menos potente na indução de agregação plaquetária quando comparada com uma mesma dose de Crotoxina (Figura 10). As crotoxinas cedidas pelos Profs Giglio e Bon também apresentaram atividade agregante, só que menos potente (resultados não mostrados).

INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR CROTOXINA - Iloprost (8 - 80 nM) e Nitroprussiato de Sódio (50 - 500 mM), inibem a agregação plaquetária induzida por Crotoxina de modo dose-dependente. Indometacina (10 μ M) não demonstrou nenhum efeito sobre a agregação de plaquetas induzida por Crotoxina (Figuras 11 e 12, respectivamente).

LIBERAÇÃO DE TROMBOXANO EM PLAQUETAS AGREGADAS COM CROTOXINA - A inibição da liberação de tromboxano através de plaquetas agregadas com Crotoxina (50 μ g/ml), foi verificada após uma pré-incubação com indometacina (10 μ M) de modo similar ao que ocorre com a Trombina (200 mU/ml), como pode ser observado na tabela II.

TEMPO DE COAGULAÇÃO DA CROTOXINA - A crotoxina (20 μ g), obtida através do fracionamento com bicarbonato de amônio (0.1 M pH 8.0), coagulou o plasma em 12 segundos (10-14 segundos, n=6). A crotoxina (20 μ g), obtida do fracionamento com tampão formiato de amônio (0.1 M pH 3.5), induziu a coagulação do plasma em 10 minutos (8-12 minutos, n=6). A fosfolipase A₂ (40 μ g), coagulou o plasma em 8 minutos (6 - 10 minutos, n=6). A crotapotina não induziu a coagulação do plasma. O tratamento do plasma rico em plaquetas com citrato de sódio, EDTA e heparina, não inibiu o efeito coagulante induzido pela crotoxina.

TABELA I- DOSE LETAL 50 DA CROTOXINA

C.d.terrificus

	DL₅₀	Via de administração	Referência
Crotoxina	0.169	i.v.	Brazil, 1972
	0.35	i.v.	Friedrich & Tu,1971
	0.3	i.p.	a*
	0.108	i.v.	Rubsamen et al.,1971
	0.082	i.v.	Brazil, 1972
	0.5	s.c.	Rubsamen et al ,1971
	0.049	i.v.	Landucci et al.,1990

a*Dados obtidos de : Poisonous Snakes of the World, A Manual for Use by U.S. Amphibious Force, published by U.S. Government Printing Office.

TABELA 2- TROMBOXANO LIBERADO DE PLAQUETAS HUMANAS LAVADAS

AGONISTA	TROMBOXANO B ₂ (ng/ml)
Trombina (200 mU/ml)	185.0 ± 9.9 (160-231*)
Trombina + Indo (10 µM)	31.6 ± 8.2 (10-66)
Crotoxina (50 µg/ml)	207.0 ± 8.6 (173-231*)
Crotoxina (50 µg/ml) + Indo (10 µg/ml)	23.5 ± 5.1 (13-47)

* $p < 0.001$ teste t Student não pareado, n=6.

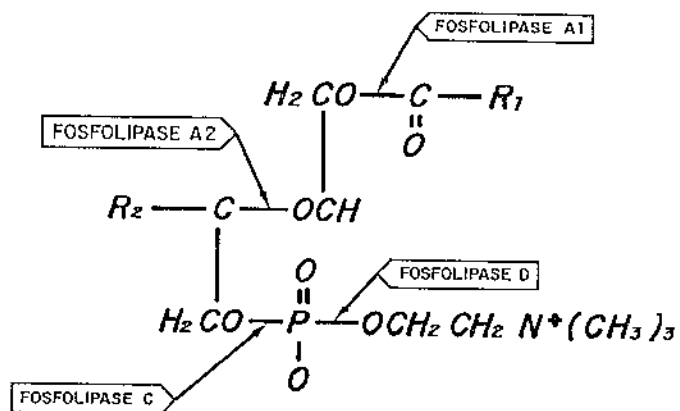


FIGURA 1- Tipos de fosfolipases e pontos de hidrólise (Hanahan, 1971).

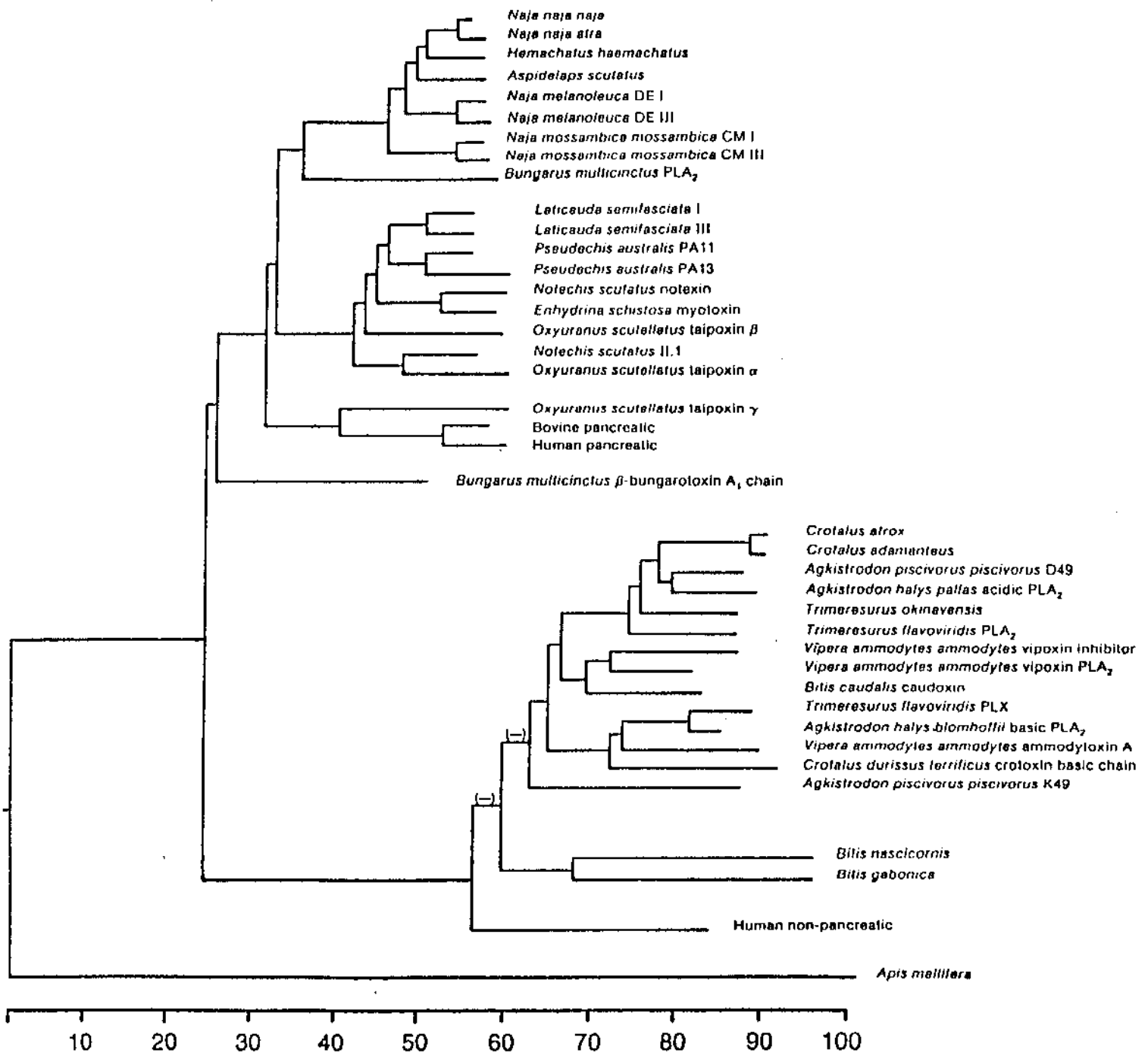


FIGURA 2 - Árvore filogenética de 40 tipos de fosfolipases A₂ provenientes de diversas fontes. Relação entre homologia em termos de sequência de aminoácidos e a provável escala evolutiva (Davidson, 1990).

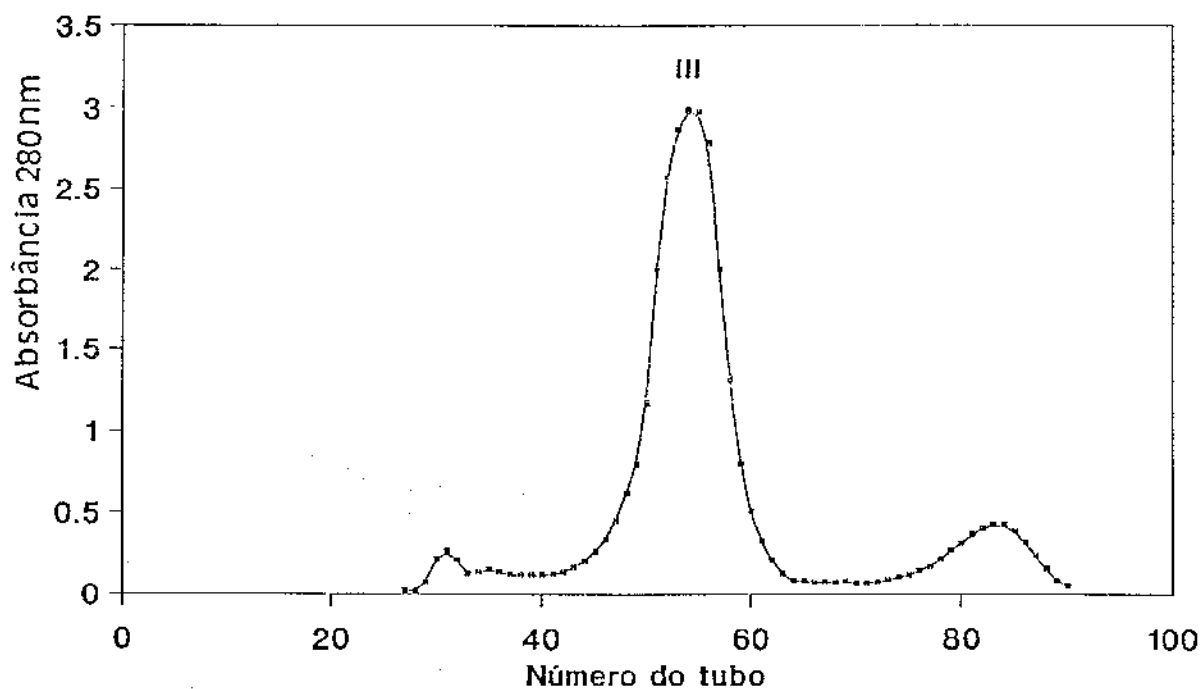


FIGURA 3- Perfil cromatográfico do fracionamento de veneno de *Crotalus durissus terrificus* em Sephadex G-75. O veneno total (50 mg/ml, 2 ml) foi aplicado em uma coluna (1.6 x 100 cm) de Sephadex pré-equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônio (0.1 M, pH 8.0). A coluna foi eluída com fluxo de 9 ml/hora e 3 ml das frações foram coletados por tubo. As frações obtidas foram monitoradas através da medida de absorbância à 280 nm. O pico III corresponde a crotoxina.

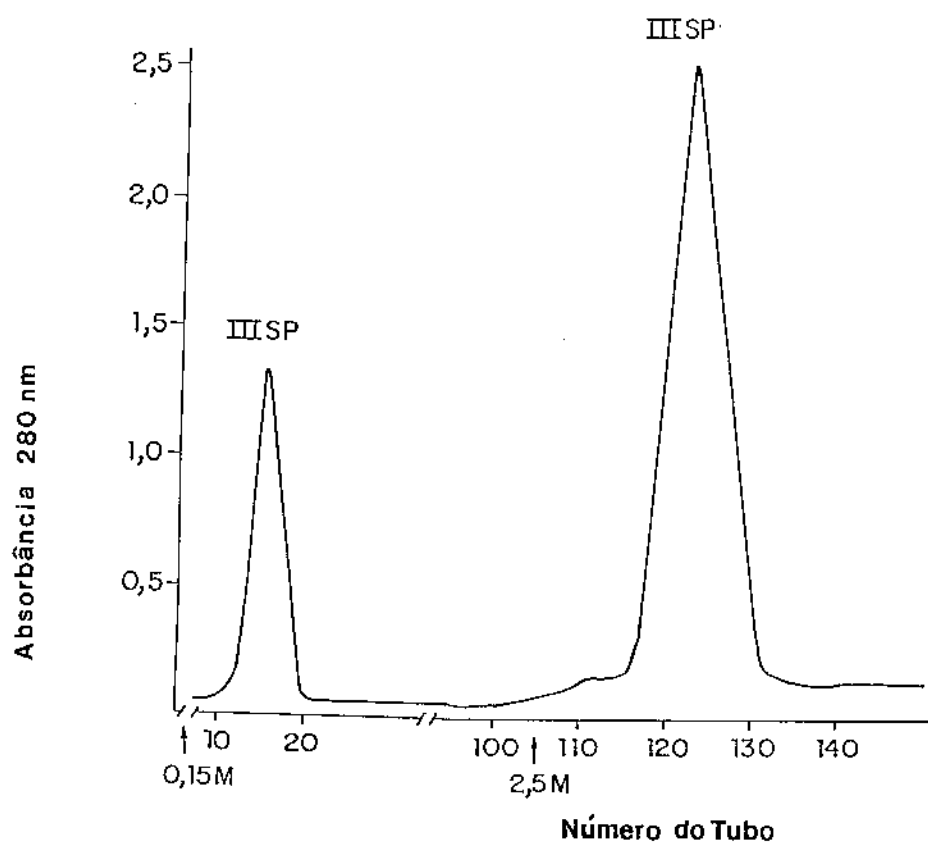
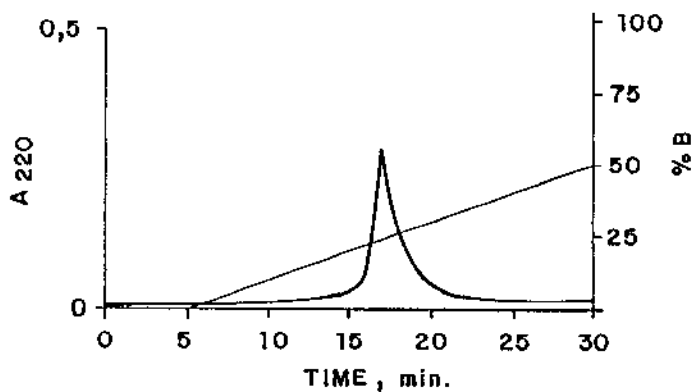
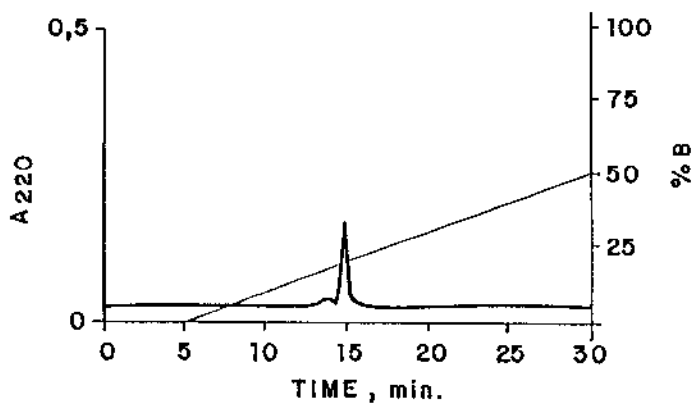
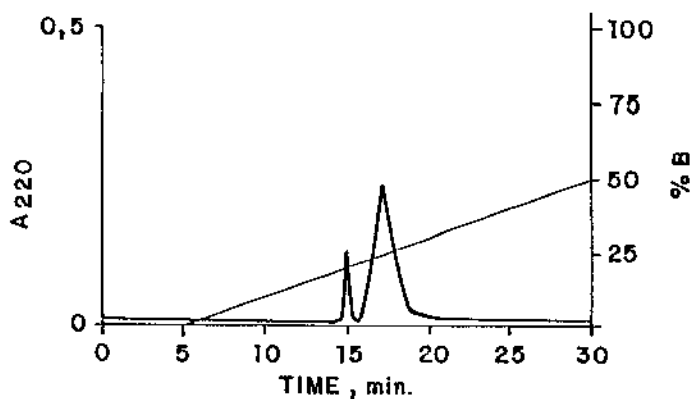


FIGURA 4- Perfil cromatográfico do fracionamento da crotoxina em SP-Sephadex C - 25. A crotoxina (100 mg, 2 ml) foi aplicada a uma coluna (1.8 x 23 cm), equilibrada e inicialmente eluída com tampão formiato de amônio (0.15 M, pH 3.5). O fluxo de eluição foi mantido constante (12 ml/hora), foram coletadas as frações (3 ml) e a absorbância monitorada à 280 nm. A fração III SP 1 corresponde a crotapotina e III SP 2 corresponde a PLA₂. O gráfico indica a mudança de molaridade do tampão.



FIGURAS 5, 6 e 7- Crotoxina obtida por gel-filtração em Sephadex G- 75, desdobrada através de cromatografia em fase reversa (HPLC). A crotoxina foi eluída em um gradiente linear de acetonitrila (0 - 60%) em 0.5% de ácido acético, pH 2.5 . A eluição das frações foram monitoradas à 220 nm. O primeiro e o segundo pico correspondem respectivamente a crotapotina e fosfolipase A₂.

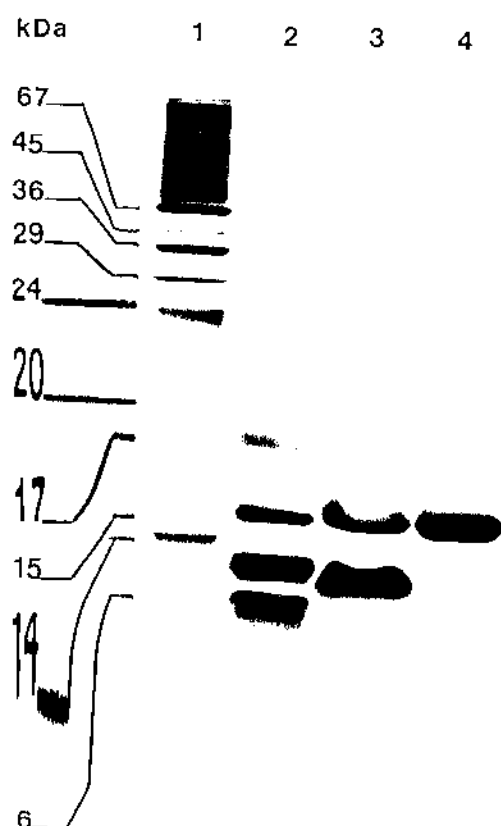


FIGURA 8 - Gel Tricina-SDS-Page. (1) Marcadores de peso molecular: BSA (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), GPD (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lacto albumina (14 kDa); (2) Marcadores de peso molecular mioglobina e fragmentos de mioglobina; (3) Veneno total de *Crotalus durissus terrificus*; (4) Crotoxina.

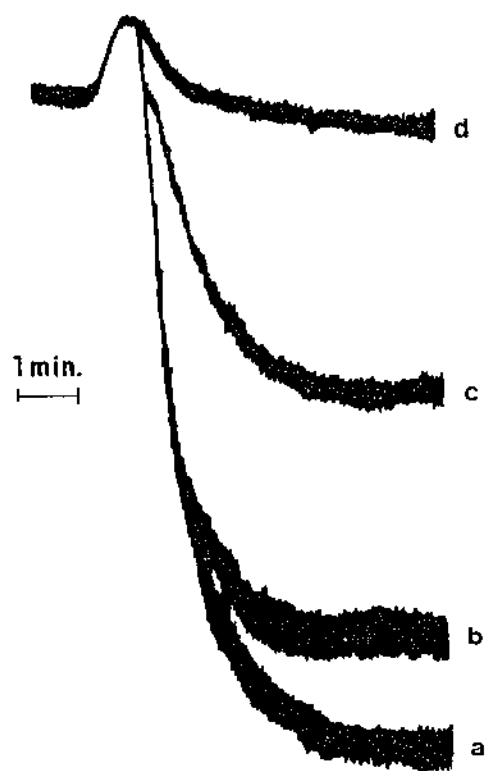


FIGURA 9 - Curva dose-resposta da crotoxina na agregação de plaquetas humanas lavadas. a- Trombina (200 mU/ml), b- Crotoxina (50 µg/ml), c- Crotoxina (25 µg/ml), d- Crotoxina (15 µg/ml).

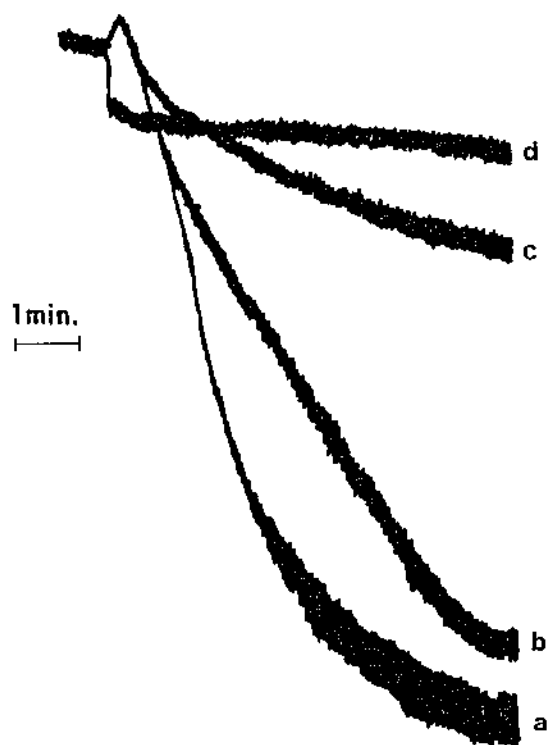


FIGURA 10 - Efeito da Trombina, crotoxina, fosfolipase A_2 e crotapotina na agregação de plaquetas humanas lavadas na presença de indometacina. Trombina (200 mU/ml) b- Crotoxina (50 $\mu\text{g/ml}$), c- fosfolipase A_2 (50 $\mu\text{g/ml}$), d- Crotapotina (50 $\mu\text{g/ml}$).

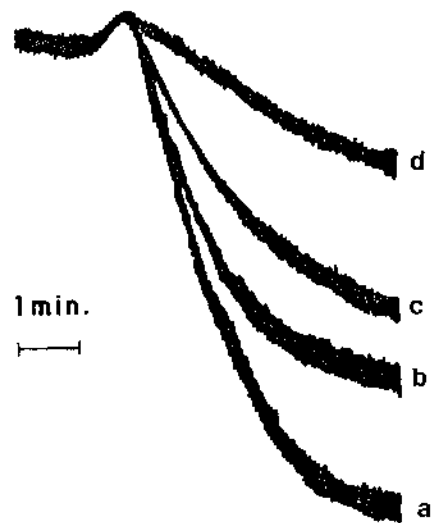


FIGURA 11 - Iloprost (8, 24 e 80 nM, indicado com *a*, *b* e *c*, respectivamente) inibe de forma dose-dependente a agregação induzida por crotoxina; *d*- crotoxina (50 µg/ml).

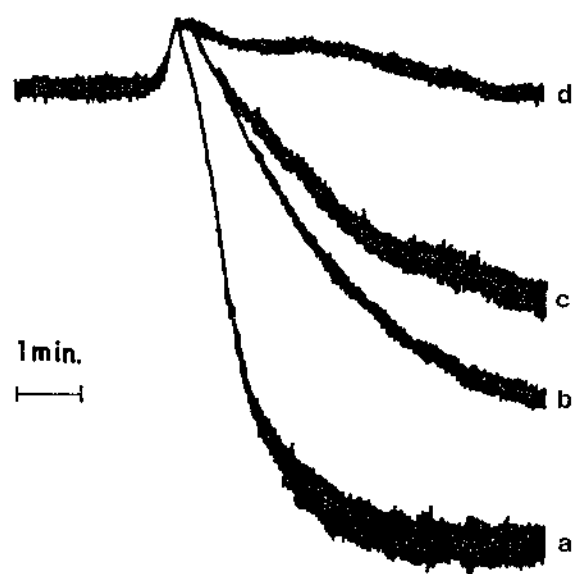


FIGURA 12 - SNP (50, 150 e 500 μM , indicado com *a*, *b* e *c*, respectivamente) inibe de forma dose-dependente a agregação induzida por crotoxina; d- crotoxina (50 $\mu\text{g/ml}$).

DISCUSSÃO

A cromatografia do veneno total em Sephadex G-75 utilizando-se como eluente o tampão Bicarbonato de amônio (0.1 M, pH 8.0), proporcionou uma boa resolução dos picos. A modificação do método original, que utiliza como eluente o tampão Formiato de amônio pH 3.5, demonstrou ser mais eficiente em termos de atividade biológica, conforme pôde ser observado através dos valores da DL₅₀. O ponto isoelétrico do complexo crotoxínico é igual a 4.71 (Li *et al.*, 1942) e a cristalização da crotoxina é obtida em pH 4.4 (Slotta *et al.*, 1955). A principal vantagem de utilizarmos um tampão com pH 8.0 foi verificada principalmente com relação à solubilidade da crotoxina; após diálise e liofilização, a crotoxina obtida através da metodologia modificada mostrou-se totalmente solúvel quando ressuspendida em solução salina tamponada (0.15 M; pH 7.4), enquanto que a crotoxina obtida através da metodologia originalmente descrita, eluída com tampão formiato de amônio pH 3.5 mostrou-se parcialmente solúvel quando ressuspendida, provavelmente devido a proximidade do valor de pH utilizado e o ponto isoelétrico da crotoxina. Outra observação feita foi quanto aos valores de pH obtidos após a ressusensão em solução salina tamponada, a crotoxina eluída em pH 8.0 apresentou um valor de pH de 6.4, enquanto que àquela eluída em pH 3.5 apresentou um valor de pH de 4.6 o que demonstra que o complexo pode estar sendo parcialmente dissociado em pH 3.5 nas suas sub-unidades (PLA₂ e crotapotina). O aumento da toxicidade em termos da DL₅₀ obtida, quando comparado aos valores descritos na literatura, confirmam o aumento do grau de pureza da crotoxina obtida através da metodologia modificada.

A PLA₂ e a crotapotina foram isoladas aumentando-se a molaridade do tampão formiato de amônio. A fração III SP1, correspondente à crotapotina, demonstrou estar pura quando cromatografada em HPLC, não apresentou nenhuma atividade biológica quando inoculada em camundongos e quando testadas nas

preparações utilizadas para os ensaios da crotoxina, além de não apresentar atividade enzimática. A fração III SP2, correspondente à PLA₂, demonstrou estar pura, apresentou atividade biológica nas preparações utilizadas, entretanto, respostas essas menos potentes quando comparadas ao complexo crotoxínico original; apresenta atividade enzimática, mostrou ser um pico único quando cromatografada em HPLC e ainda, a sequência dos vinte primeiros resíduos de aminoácidos da cadeia N-terminal obtida foi igual àquele descrita em literatura. Através dos dados obtidos pudemos concluir que a crotapotina assim como a PLA₂ isoladas por essa metodologia podem ser consideradas quimicamente puras.

A atividade mais estudada da crotoxina é a capacidade desta toxina em inibir a liberação da transmissão da junção neuromuscular (Hawgood & Smith, 1977; Chang & Lee, 1977). Outra atividade descrita é a miotoxidade, devida a sua atividade fosfolipásica, a qual é potencializada pela crotapotina (Gopalakrishnakone, 1984). A maior e mais séria complicação do envenenamento crotálico, é a insuficiência renal aguda com necrose tubular, descrita como nefrose do néfron intermediário (Amorin & Mello, 1954), que pode ocorrer em consequência de uma toxicidade renal mioglobínica secundária, seguida da indução da rabdomiólise (Azevedo- Marques, 1985; Cupo, 1988).

O papel das plaquetas no envenenamento crotálico não foi ainda estabelecido. Por outro lado, a convulxina, uma proteína isolada do veneno de serpentes do gênero *Crotalus*, causa agregação plaquetária (Prado-Franceschi, 1981). Nosso trabalho demonstra que a crotoxina agrega plaquetas humanas lavadas de forma dose-dependente e irreversível. Similarmente ao PAF (Benveniste, 1972), trombina (Smith, 1969) e convulxina (Vargaftig, 1980), a agregação plaquetária induzida pela crotoxina mostrou-se independente do bloqueio da ciclo-oxigenase; entretanto, foi detectada a formação de tromboxano. A liberação de tromboxano B₂ induzida por crotoxina é justificável, pois, um de seus componentes é a fosfolipase A₂. A agregação induzida

pela crotoxina é diferenciada por causar uma injúria inespecífica em membranas de plaquetas, visto que a ativação do sistema clássico do segundo mensageiro, AMPc (Haslam, 1978) e GMPc (Mellion, 1981), são capazes de inibir a agregação plaquetária.

Embora a agregação induzida pela crotoxina não seja dependente da liberação de tromboxano, não podemos afastar a liberação do ácido araquidônico como o possível mecanismo de ação da crotoxina. A ativação de receptores da membrana plaquetária causa hidrólise dos fosfoinositóis pela fosfolipase C, gerando inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 causa liberação de cálcio de organelas intracelulares, enquanto que, o DAG causa ativação de proteína quinase C (Dennis *et al.* 1991). A liberação de cálcio intracelular causa ativação da PLA₂ com consequente liberação de ácido araquidônico (Rana & Hokin, 1990). O DAG pode ainda ser metabolizado por duas enzimas, a DAG quinase e a DAG lipase. A DAG quinase resulta na formação do ácido fosfatídico, o qual é utilizado na síntese *de novo* dos fosfoinositóis. Em plaquetas de cavalo, o ácido fosfatídico também causa ativação plaquetária. A DAG lipase gera o monoacilglicerol e ácido araquidônico, sendo esta uma via de liberação de AA independente da ativação de PLA₂. Em células endoteliais de aorta bovina desenvolvidas em cultura, ácido araquidônico exógeno causa liberação concomitante de prostaciclina e EDRF através da ativação de fosfolipase C (de Nucci *et al.*, 1988), provavelmente devido a metabólitos gerados por mono-oxigenases (McGiff *et al.*, 1969). Assim sendo, um possível mecanismo de ação para o efeito agregante da crotoxina seria a ativação de fosfolipase C pela liberação de ácido araquidônico. Entretanto, devemos lembrar que a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico exógeno é inibida pela indometacina, indicando que é necessário outras etapas para ocorrência desta ativação.

Conforme visto acima, o aumento de cálcio intracelular é um fator essencial para a agregação plaquetária. É possível que a crotoxina, atuando em fosfolipídeos

BIBLIOGRAFIA

- Aird, S.D.; Kaiser, I.I.; Lewis, R.V.; Kruggel, W.G. (1986). A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **249**: 296-300.
- Amara, S.G.; Jonas, V.; Rosenfeld, M.G. (1982). Alternative processing calcitonin gene expression generates m RNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, **298**: 240-244.
- Amaral, C.F.S.; Silva, da O.A.; Godoy, P.; Miranda, D. (1985). Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, **23**: 877- 885.
- Amaral, C.F.S.; Rezende, N.A.; Silva, O.A.; Ribeiro, M.M.F.; Magalhães, R.A.; Reis, R.J.; Carneiro, J.G.; Castro, J.R.S. (1986). Insuficiência renal aguda secundária acidentes ofídicos *Botrópico* e *Crotálico* . Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **28**: 220-227.
- Amorim, M. de F.; Mello, R.F. (1954). Intermediate nephrosis from snake poisoning in man. **Am.J.Pathol.**, **30**: 479-499.
- Apitz-Castro R.; Cruz, M.; Mas, M.; Jain, M.K. (1981). Further studies on a phospholipase A₂ isolated from human platelet plasma membranes. **Thromb. Res.**, **23**: 347-350.
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A.; Oliveira, J.A. (1982). Mionecrose e insuficiência renal aguda mioglobínúrica após acidente crotálico. **Livro de Programa e Resumos do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **J.2**.
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A.; Laure, C.J. (1982). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus* envenomation in Brazil. **Toxicon**, **23**: 631-636.
- Bach, M.K. (1984) . Prospects for the inhibition of leukotriene syntesis. **Biochemical Pharmacology**, **33**: 515-521.
- Barrington, P.L.; Soons, K.R.; Rosenberg, P. (1986). Cardiotoxicity of *Naja nigricollis* phospholipase A₂ is not due to alterations in prostaglandin synthesis. **Toxicon**, **24**: 1107-1116.

Barrington,P.L.; Yang,C.; Rosenberg,P. (1984). Cardiotoxic effects of *Naja nigricollis* venom phospholipase A₂ are not due to phospholipid hydrolytic products. *Life Sciences*, **35**: 987-995.

Benveniste,J.; Henson,P.M.; Cochrane,C.G. (1972). Leukocyte- dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet activating factor. *J. Exp. Med.*, **136**: 1356-1377.

Bon,C.; Changeux,T.J.; Fraenkel-Conrat,H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, **99**: 471-481.

Born,G.V.R.; Cross,M.J. (1963). The aggregation of blood platelets. *J. Physiol. (London)*, **168**: 178-195.

Brazil,O.V. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin . II.Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan*, **33**: 981-992.

Breithaupt,H. (1976). Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotapotin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmac.*, **292**: 271-278.

Breithaupt,H. (1976). Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon*, **14**: 221-233.

Chang,C.C.; Lee,C.Y. (1977). Crotoxin the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β - bungarotoxin. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **296**: 159- 168.

Chang,J.; Musser,J.H.; McGregor,H. (1987). PhospholipaseA₂: Function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology*, **36**: 2429-2436.

Chien,K.R.; Sherman,C.; Mittnacht,S.; Farber,J.L. (1980). Microsomal membrane structure and function subsequent to calcium activation of an endogenous phospholipase. *Arch.Biochem.Biophys.*, **205**: 614-622.

Cole,B.; Robison,G.A.; Hartmann,K.C. (1971). Studies on the role of cyclic AMP in platelet function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **185**: 477-487.

Colman,R.W.; Puri,R.N.; Zhou,F.; Colman,R.F. (1988). Aggregin: the platelet receptor mediating activation by ADP. In: *Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology*, ed. by G.A.Jamieson, pp. 263-277, Alan R. Liss Inc., New York.

Condrea,E.; de Vries,A. (1964). Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. **Biochem. Biophys. Acta**, **84**: 60-73.

Condrea,E. (1974). Membrane-active polypeptides from snake venom:Cardiotoxins and haemocytotoxins. **Experientia**, **30**: 121-129.

Condrea,E. (1979). Hemolytic effects of snake venoms.In:**Snake venoms**.Edited by C.Y.Lee. **Springer-Verlag, Berlin**. pp. 448-479.

Cramer,E.M.; Meyer,D.; LeMenn,R.; Breton-Gorius,J. (1985). Eccentric localization of von Willebrand factor within a tubular structure of platelet α -granule resembling that of Weibel-Palade bodies. **Blood**, **66**: 710-715.

Cupo,P.; Azevedo-Marques,M.M.; Hering,S.E. (1988). Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (***Crotalus durissus terrificus***) envenomation in children.**Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **82**: 924-929.

Davidson,F.F.; Dennis,E.A. (1990). Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase_A₂ from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.**, **31**: 228 - 238.

de Nucci,G.; Gryglewski,R.G.; Warner,T.D.; Vane,J.R. (1988). Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **85**: 2334-2338.

Dennis,E.A.; Rhee,S.G.; Billah,M.M.; Hannun,Y.A. (1991). Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB J.**, **5**: 2068-2077.

Dodds,W.J. (1978). Platelet function in animals: species specificities. In: **Platelets: A Multidisciplinary Approach**, ed. by G. de Gaetano and S. Garattini, pp. 45-59, **Raven Press, New York**.

Dutilh,C.E.; Haddeman,E; Don,J.A.; Ten Hoor,F. (1981). The role of arachidonate lipoxygenase and fatty acids during irreversible blood platelet aggregation in vitro. **Prostaglandins and Medicine**, **6 (2)** : 111-126.

Edman,P.; Begg,G. (1967). A protein sequenator. **Eur.J.Biochem.**, **1**: 80-91.

Flower R.J.; Blackwell,J. (1976). The importance of phospholipase- A₂ in prostaglandin biosynthesis.**Biochemical Pharmacology**, **25**: 285- 291.

Fraenkel-Conrat,H.; Jeng,T.W.; Hsiang,M. (1980). Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: **Natural Toxins**, pp. 561 (Eaker,D. and Wadstrom,T. Eds.). Oxford: Pergamon Press.

Furchgott,R.F.; Zawadzki,J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376.

Gopalakrishnakone,P; Dempster,D.W.; Hawgood,B.J.; Elder,H.Y. (1984). Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, **22**: 791-804.

Grette,K. (1962). Studies on the mechanism of thrombin-catalysed hemostatic reaction in blood platelets. **Acta Physiol. Scand.**, **56** (195): 1-4.

Gryglewski,R.J.; Panczenko,B.; Korbut,R.; Grodzinska,L.; Ocetkiewicz,A. (1975). Corticosteroids inhibit prostaglandin release from perfused mesenteric blood vessels of rabbit and from perfused lungs of sensitized guinea-pigs. **Prostaglandins**, **10**: 343-355.

Hamberg,M.; Samuelsson,B. (1975a). Prostaglandin endoperoxides. VII. Novel transformation of arachidonic acid in guinea-pig lung. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **61**: 942-949.

Hamberg,M.; Svensson,J.; Samuelsson,B. (1975b). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **72**: 2994-2998.

Hamberg, M., Svensson, J.; Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **72**, 2994-2996.

Hanahan,D.J. (1971). Phospholipases. **The Enzymes**, **V**: 71-85.

Hardisty,R.M.; Hutton,R.A. (1967). Bleeding tendency associated with new abnormality of platelet behavior. **Lancet**, **1**: 983-984.

Harris,J.B. (1984). In: **Progress in medicinal chemistry**. Ellis,G.P.;West,G.B. Elsevier Science Publishers,B.V., **21**: 64.Holland, Amsterdam.

Haslam,R.J.; Davidson,M.M.L.; Fox,J.E.B.; Lynham,J.A. (1978). Cyclic nucleotides in platelet function. **Thromb. Haemostas.**, **40**: 232-240.

Hawgood,B.J.; Smith,J.W. (1979). The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from the venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmacol.** , **61**: 597-606.

Hendon,R.A.; Fraenkel-Conrat,H. (1971). Biological role of the two components of crotoxin.**Proc. Natl. Acad. Sci.(Wash)**, **68**: 1560-1563.

Huang,E.M.; Detwiler,T.C. (1980). Reassessment of the evidence for the role of secreted ADP in biphasic platelet aggregation. **J. Lab. Clin. Med.**, **95**: 59-68.

Iatridis,S.G.; Iatridis,P.G.; Markidou,S.G.; Ragatz,B.H. (1976). Inhibition of human platelets by phospholipase-A. **Thromb. Res.**, **9**: 335-344.

Ignarro,L.J. (1989). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circ. Res.**, **65**: 1-21.

Jakobs, K.H.; Minuth, M. (1987). Agonists and receptors: catecholamines. In: **Platelet responses and metabolism: receptors and metabolism**, ed. by H. Holmson, vol.II pp. 37-56, CRC Press, Boca Raton, FL.

Kaplan, K.L. (1981). Platelet granule proteins: Localization and secretion. in: **Platelets in Biology and Pathology**, ed. by J.L.Gordon, vol 2, p 77. North

Kelm,M.; Feelisch,M.; Deuben,A.; Schrader,J.; Strauer,B. (1991). The role of nitric oxide in the control of coronary vascular tone in relation to partial oxygen pressure, perfusion pressure and flow. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, **17**: S 95-S 99.

Kerry, R.; Scrutton, M.C.; Wallis, R.B. (1984). Mammalian platelet adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.**, **81**: 91-102.

Kerry,R.; Scrutton,M.C. (1985). Platelet adrenoceptores. In: **The Platelets: Physiology and Pharmacology**, ed. by G.L.Longenecker, pp. 113-157. Acad. Press, Orlando, FL.

Kini,R.M.; Evans,H.J. (1988). Mechanism of platelet effects of cardiotoxins from *Naja nigricollis crawshawii* (spitting cobra) snake venom. **Thromb. Res.**, **52**: 185-195.

Kini,R.M.; Evans,H.J. (1990). Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, **28**: 1387-1422.

Kinlough-Rathbone,R.L.; Packham,M.A.; Reimers,H.I. (1977). Mechanisms of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, and release induced by collagen, thrombin or A23187. **J. Lab. Clin. Med.**, **90**: 707-711.

Kouyoumdjian,J.A.; Harris,J.B.; Johnson,M.A. (1986). Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon** , **24**: 575- 583.

Kunze,H.; Vogt,W. (1971). Significance of phospholipase A for prostaglandin formation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **180**: 123-125.

Lagarde,M.; Menashi,S.; Crowford,B. (1981). Localisation of phospholipase A₂ and diglyceride lipase activities in human platelet intracellular membranes. **FEBS Letters**, **124 (1)**: 23-26.

Landucci,E.C.T; Farah,M.F.L; Rennebeck,G.M.; Reis,E.R.; Oliveira,B.; Marangoni,S. (1990). Crotoxina de alta toxicidade obtida da purificação do veneno de **Crotalus durissus terrificus** .V Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, **12.30**: 401.

Lee,C.Y.; Chang,C.C.; Chiu,T.H.; Chiu,P.J.S.; Tseng,T.C.; Lee,S.Y. (1968). Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from **Formosan** cobra venom. **Arch. Exp. Pathol. Pharmokol.**, **259**: 360.

Lee,C.Y.; Lin,J.S.; Wei,J.W.(1973). In:**Toxins of animal and plant origin**. Devries,A.;Kochva,E. New York.Gordon and Breach. pp 307.

Lee,C.Y.; Ho,C.L. (1978). Pharmacology of snake toxin with phospholipase A₂ activity. In: **C.H.L.(Ed.),Versatility of Proteins,Academic Press,New York**, 433-446.

Li,C.H.; Fraenkel-Conrat,H. (1942). Electrophoresis of crotoxin. **Am.Chem.Soc.**, **64**: 1586-1588.

Longenecker,G.L. (1985). Platelet arachidonic acid metabolism. In: **The Platelets: Physiology and Pharmacology**, ed by G.L. Longenecker,pp. 159-185, Academic Press, Orlando, FL.

Louw,A.I. (1974). The purification and properties of five non-neurotoxic polypeptides from **Naja mossambica mossambica** venom. **Biochem.Biophys.Acta**, **336**: 470-480.

Marcus, A.J. (1969). Platelet function. **N. Engl. J. Med.**, **280**: 1213.

Marin,J.; Sanchez-Ferrer,C.F. (1990). Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. **Gen. Pharmac.**, **21**: 575-587.

McGiff,J.C.; Terragno,N.A.; Strand,J.C.; Lee,J.B.; Lonigro,A.J. (1969). Selective passage of prostaglandins across the lung. **Nature**, **223**: 742-745.

McIntyre,D.E. (1981). Platelet prostaglandin receptors. In: **Gordon J.L. ed.: Platelets in Biology and Pathology 2. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, p.211.**

Meldrum,B.S. (1963). Depolarization of skeletal muscle by a toxin from cobra (*Naja naja*) venom. **J.Physiol. Lond.**, **168**: 49 P-50 P.

Mellion,B.T.; Ignarro,L.I.; Ohlstein,E.H.; Pontecorvo,E.G.; Hyman,A.L.; Kadowitz,P.J. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-Monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood**, **57**: 946-955.

Merril,C.R.; Goldman,D.; Van Keuren,M.I. (1984). Gel protein stains: silver stain. **Methods in Enzymology**, **104**: 441-447.

Mills,D.C.B. (1982). The role of cyclic nucleotides in platelets. In: **Kebanian J.W., Nathanson J.A. eds. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 58/II, p. 723.**

Mitchell,J.R.A.; Sharp,A.A. (1964). Platelet clumping in vitro. **Br. J. Haematol.**, **10**: 78-80.

Moncada,S.; Palmer,R.M.J.; Higgs,E.A. (1991). Nitric Oxide:Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, **43**:109-142.

Mustard,J.F.; Perry,D.W.; Kin Lough-Rattibone,R.L.; Packham,M.A. (1975). Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. **Am. J. Physiol.**, **228**: 1757-1765.

Nahas,L.; Denson,K.W.E.; Mcfarlane R.G. (1964). A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thrombos. Diathes Haemorrh (Stuttg)**, **12**: 355-369.

Needleman,P.; Bryan,B.; Wyche,A.; Bronson,S.D.; Eakins,K.; Ferrendelli,J.A.; Minkes,M. (1977). Thromboxane synthetase inhibitors as pharmacological tools: differential biochemical and biological effects on platelet. **Prostaglandins**, **14**: 897-907.

Needleman,P.; Minkes,M.; Raz,A. (1976). Thromboxanes : selective biosynthesis and distinct biological properties. **Science**, **193**: 163-165.

Niewiarowski, S. (1977). Proteins secreted by the platelet. **Thromb. Haemost.** **38**: 924-929.

O'Brien,J.R. (1963). Some effects of adrenaline and antiadrenaline compounds on platelet *in vitro* and *in vivo*. **Nature**, **200**: 763-764.

Ouyang,C.; Teng,C.M. (1979). The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Thromb. Haemos.**, **41**: 475-490.

Ouyang,C.; Huang,T.F. (1984). Effect of the purified phospholipase A₂ from snake and bee venoms on rabbit platelet function. **Toxicon** , **22**: 705-718.

Palmer,R.M.J.; Ferrige,A.G.; Moncada,S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor . **Nature**, **327**: 524-526.

Palmer,R.M.J.; Ress,D.D.; Ashton,D.S.; Moncada,S. (1988b). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxion.**Biochem. Biophys.Res.Commun.**, **153**: 1251-1256.

Pennington,D.G. (1981). Formation of platelets. In **Platelets in Biology and Pathology** .ed. by J.L.Gordon, pp. 19-41, Elsevier, Amsterdam.

Piper,P.; Vane,J. (1971). The release of prostaglandins from lung and other tissues.**Annals N.Y.Academy of Sciences**, **180**: 363-385.

Prado-Franceschi,J.; Tavares,D.Q.; Hertel,R.; Lobo de Araujo,A. (1981) Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. **Toxicon**, **19**: 875-887.

Radomski,M.W.; Moncada,S. (1983). An improved method for washing human platelets with prostacyclin. **Thromb. Res.**, **30**: 383-389.

Radvanyi,F.R.; Bon,C. (1982). Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin.Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. **J.Biol.Chem.**, **257**: 12616-12623.

Rana,R.S.; Hokin,L.E. (1990). Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. **Phys. Rev.**, **70**: 115-162.

- Rand, M.; Ried, G. (1951). Source of serotonin in serum. *Nature*, **168**: 385-386.
- Rapport, M.M.; Green, A.A.; Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, **176**: 1243-1246.
- Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous animals and their venoms** (Bucherl, W.; Buckley, E.E. eds). New York. Academic Press, II: 345-362.
- Rosenfeld, M.G.; Mermod, J.J.; Arara, S.G. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene with tissue-specific RNA processing. *Nature*, **304**: 129-135.
- Roth, G.J. (1986). Platelet arachidonate metabolism and platelet-activating factor. In: **Biochemistry of Platelets**, ed. by D.R. Phillips and M.A. Shuman, pp.69-113, Academic Press, Orlando, FL.
- Rubsamen, K.; Breihaupt, H.; Habermann, E. (1971). Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **270**: 274-288.
- Salmon, J.A. (1978). A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$. *Prostaglandins*, **15**: 383-397.
- Sander, H.J.; Slot, J.W.; Bouma, B.N. (1983). Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and β -thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *J. Clin. Invest.*, **72**: 1277-1280.
- Santoro, S.A. (1986). Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent-cation dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.*, **46**: 913-915.
- Satto, T.; Wolf, A.; Menon, N.K.; Saeed, M.; Bing, R.J. (1988). Lysolecithins as endothelium - derived relaxing factor (Nitric Oxide). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 8246-8250.
- Schagger, H.; Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Schorr, K. (1990). Thromboxane A_2 and platelets as mediators of coronary arterial vasoconstriction in myocardial ischaemia. *European Heart Journal*, **11**: 27-34.

Scott,D.L.; White,S.P.; Otwinowski,Z.; Yuan,W.; Gelb,M.H.; Singler,P.B. (1990). *Interfacial Catalysis: The mechanism of phospholipase A₂* . **Science**, **250**: 1541-1546.

Shimizu,T.; Wolfe,L.S. (1990). *Arachidonic acid cascade and signal transduction*. **Journal of Neurochemistry**, **55**: 1-15.

Shipolini,R.A.; Callewaert,G.L.; Cottrell,R.C.; Vernon,C.A. (1974). *The amino-acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A₂ from bee venom*. **Eur. J. Biochem.** **48**: 465-476.

Siegel,M.I.; McConnel,R.T.; Abrahams,S.L.; Porter,N.A.; Cuatrecasas,P. (1979a). *Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and ciclo-oxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase*. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, **89**:1273-1280.

Siegel,M.I.; McConnel,R.T.; Cuatrecasas,P. (1979b). *Aspirin-like drugs interfere with arachidonate metabolism by inhibition of the 12-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid peroxidase activity of the lipoxygenase pathway*. **Proc. of the National Acad. of Sciences of the USA**,**76**: 3774-3777.

Slotboom,A.J.; Verheij,H.M.; Haas,G.H. (1982). In: **Phospholipids** . Elsevier, Amsterdam (eds. Hawthorne,J.N. and Ansell,G.B.), 359-435.

Slotta,K.H.; Fraenkel-Conrat,H.L. (1938). *Schlangengifte,III: Mitteilung Reinigung und krystallization des klapperschlangengiftes*. **Ber.Dtch.Chem.Ges.**,**71**:1076-1081.

Slotta,K.H. (1955). *Chemistry and biochemistry of snake venoms*. **Fortschr. Chem.Org.Naturst.** ,**12**:406-465.

Smith,J.B.; Ingeman,C.; Kocsis,J.J.; (1973). *Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets*. **J. Clin. Invest.**, **52**: 965-969.

Smith,S.V.; Brinkhous,K.M. (1991). *Inventory of exogenous platelet-aggregating agents derived from venoms*. **Thromb. Haemostas.**, **66**: 259-263.

Smith,J.G.; Willis,A.L. (1971). *Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets*. **Nature**, **231**: 235-237.

Smith,J.B.; Willis,A.L. (1970). *Formation and release of prostaglandins by platelet in response to thrombin*. **British Journal of Pharmacology**, **40**:545P-546P.

Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group (1989). *Final report on the aspirin component of the ongoing physicians'health study*. **N. Engl. J. Med.**, **321**: 129-135.

Stryer, L. (1988). Hormone action In: **Biochemistry ed. by W.H. Freeman and Company, N.Y., chap. 38: 975-1004.**

Tu, A.T. (1977). Venoms of **Crotalidae (Crotalids, Pitvipers)** In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology, 14:211-233.**

Turpie, A.G.G., Hirsh, J. (1978). Platelet suppressive therapy. **Br. Med. Bull., 34: 183.**

Vadas, P.; Pruzanski, W. (1986). Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Laboratory Investigation, 55: 391-404.**

Vane, J.R. (1964). The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. **Br. J. Pharmacol. Chemother., 23: 360-373.**

Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. **Nature New Biology, 231: 232-235.**

Vargaftig, B.B.; Dao, N. (1971). Release of vaso-active substances from guinea-pig lungs by slow reacting substance C and arachidonic acid. Its blockade by nonsteroid anti-inflammatory agents. **Pharmacology, 6: 99-102.**

Vargaftig, B.B.; Dao, N. (1972). Selective inhibition by mepacrine of the release of rabbit aorta contracting substance evoked by administration of bradykinin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, 24:159-162.**

Vargaftig, B.B.; Zirinis, P. (1973). Platelet aggregation induced by arachidonic acid is accompanied by release of potential inflammatory mediators distinct from PGE₂ and PGF₂ α. **Nature New Biology, 244:114-116.**

Vargaftig, B.B.; Prado-Franceschi, J.; Chignard, M.; LeFort, J.; Marlas, G. (1980). Activation of guinea pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of **Crotalus durissus cascavella**. **Eur. J. Pharmacol. 68: 451-464.**

Verheij, H.M.; Slotboom, A.J.; Haas, G.H. (1981). Structure and function of phospholipase A₂. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 91: 92-203.**

Vogt, W.; Meyer, U.; Kunze, H.; Lufft, E.; Babilli, S. (1969). Entstehung von SRS-C in der durchstromten Meerschweinchenlunge durch Phospholipase A. Identifizierung mit prostaglandin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. Pharmakologie, 262: 124-134.**

Vogt, W.; Suzuki, T.; Babilli, S. (1966). Prostaglandins in SRS-C and in darmstoff preparation from frog intestinal dialysates. **Memories of the Society of Endocrinology, 14:137.**

Warner, T.D.; de Nucci, G.; Vane, J.R. (1989). Comparison of the survival of endothelium - derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. **Br.J.Pharmacol.**, **97**: 777-782.

Weil, C.S. (1952). Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD_{50} or ED_{50}) and instructions for their use. **Biometrics**, **8**: 249-263.

White, J.G.; Krivit, W. (1967). An ultrastructural basis for the shape change induced by chilling. **Blood**, **30**: 625-635.

Willis, A.L.; Kuhn, D.C. (1973). A new potential mediator of arterial thrombosis whose biosynthesis is inhibited by aspirin. **Prostaglandins**, **4**:127-130.

Zucker-Franklin, D. (1988). Megakaryocytes and platelets, in: **Atlas of Blood Cells: Function and Pathology**, 2d ed, edited by D Zucker-Franklin, chap 10, p 621. Lea and Febiger, Philadelphia.

ABSTRACT

Crotoxin, the main toxic component isolated from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, is a reversible protein complex composed of a non-toxic non-enzymatic acid peptide (crotopotin) and a toxic basic phospholipase A₂ (PLA₂). Since several venom proteins interfere in blood coagulation and platelet aggregation, the objective of this study was to evaluate whether crotoxin induces human washed platelet aggregation. Crotoxin was isolated by gel filtration of the crude venom on a Sephadex G-75 column eluted with ammonium bicarbonate buffer (0.1 M, pH 8.0). Human washed platelet aggregation was monitored in a Payton aggregometer and thromboxane release by direct RIA. Fractionation of 100 mg of *Crotalus durissus terrificus* venom yielded three main peaks, of which the second contained crotoxin. The purity of crotoxin was confirmed by high pressure liquid chromatography analysis on a C 18 μ Bondapack column. Crotoxin (15-50 μ g/ml) produced dose-dependent and irreversible human washed platelet aggregation, which was inhibited by pre-incubation of the platelets with SNP (500 μ M) or iloprost (100 nM). Crotoxin also induced TXB₂ release (207 \pm 8 ng/ml, n=6), it did not inhibit crotoxin-induced aggregation. Our results clearly demonstrate that crotoxin induces human washed platelet aggregation. Although previous reports state that crotoxin does not induce platelet aggregation, we presume that the difference observed is due to the procedure we have used (ammonium bicarbonate buffer instead of formate buffer) to elute crotoxin.