

224669

*Dissertação de Mestrado, apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.*

## Campinas 1999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B142e      Badin, Christiane Aparecida  
              Estudo da trombose pulmonar causada pela peçonha da cascavel sul-  
americana (*Crotalus durissus*) e suas frações / Christiane Aparecida  
Badin. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

              Orientador : Júlia Prado-Franceschi  
              Tese ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas.

              1. Agregação plaquetária. 2. Heparina. 3. Convulxina. I. Júlia  
Prado-Franceschi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. III. Título.

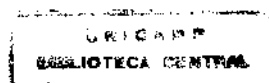
**Christiane Aparecida Badin**

**ESTUDO DA TROMBOSE PULMONAR CAUSADA PELA  
PEÇONHA DA CASCABEL SUL-AMERICANA  
(*Crotalus durissus*) E SUAS FRAÇÕES**

**Orientadora: *Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi***

**Campinas**

**1999**



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

**Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi**

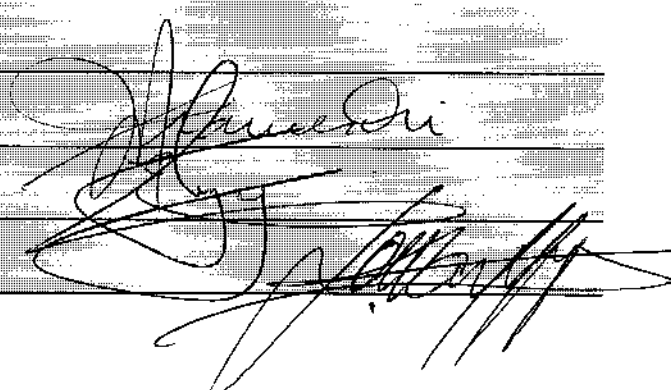
---

**Membros:**

**1. Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi**

**2. Prof. Dr. Edson Antunes**

**3. Prof. Dr. José Carlos Cogo**



**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 12/11/99**

---

*A DEUS!*

*A meus pais, que me ensinaram  
a caminhar pela vida com  
humildade, honestidade e  
sempre me deram muito amor.*

*Ao Marcelo, por compartilhar  
minhas dívidas e inseguranças,  
pelo estímulo constante e  
suporte nos momentos difíceis.*

*Amo vocês.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

À Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi, pela oportunidade do trabalho, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, pela co-orientação e apoio.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela orientação e segurança transmitida em todo o processo bioquímico e ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela colaboração.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação.

À Marta Pitalli Buzin, pela ajuda, carinho e amizade.

À Maria Helena, por toda ajuda durante a confecção desta tese, e pela paciência de uma amiga.

Às amigas Juliane, Luciene, Mirian, Elaine e Fernanda, pelos momentos de descontração.

Aos técnicos Gildo, Miguel e, especialmente, ao José Ilton, pelo apoio e amizade.

À Dra. Miriam Trevisan, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório, a todos os alunos do Curso de Pós-Graduação e funcionários do Departamento de Farmacologia, pela convivência amigável.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Peçonhas	2
1.2. Dados epidemiológicos	2
1.3. Classificação das serpentes	3
1.4. Gênero <i>Crotalus</i>	3
1.5. Convulxina	5
1.6. Hemostasia	6
1.6.1. Hemostasia normal	6
1.6.2. Plaquetas: estruturas e funções	7
1.6.3. Agregação plaquetária	8
1.6.4. Coagulação	9
1.6.5. Mecanismos anticoagulantes naturais	11
1.6.6. Trombose	12
1.6.7. Venenos e hemostasia	12
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	14
2.1. Estudos bioquímicos	15
2.2. Estudos farmacológicos	16
2.3. Estudos histológicos	17
2.4. Agregação plaquetária	17
2.5. Coagulação	18
2.6. Análise estatística	19
<b>3. RESULTADOS</b>	20
3.1. Estudos bioquímicos	21
3.2. Estudo histológicos e farmacológicos	23
3.3. Efeito de diversas drogas na trombose pulmonar induzida pela convulxina	30
3.4. Agregação plaquetária	38
3.5. Coagulação	40
<b>4. DISCUSSÃO</b>	41
<b>5. CONCLUSÕES</b>	46
<b>6. SUMMARY</b>	48
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Crotalus durissus cascavella</i> .....	4
<b>Figura 2:</b> Cascata da coagulação (vias intrínseca e extrínseca).....	10
<b>Figura 3a:</b> Perfil de eluição do veneno de <i>C. d. terrificus</i> em Sephadex G-75.....	21
<b>Figura 3b:</b> Perfil de eluição da fração I do veneno de <i>C. d. terrificus</i> em Sephadex G-75.....	21
<b>Figura 3c:</b> Perfil de eluição do veneno de <i>C. d. cascavella</i> em Sephadex G-75.....	21
<b>Figura 3d:</b> Perfil de eluição da fração I do veneno de <i>C. d. cascavella</i> em Sephadex G-75.....	21
<b>Figura 4:</b> Perfil eletroforético da convulxina do veneno de <i>C. d. terrificus</i> .....	22
<b>Figura 5:</b> Trombose pulmonar induzida em camundongos pelos venenos de <i>C. d. terrificus</i> (A) e <i>C.d.cascavella</i> (B).....	24
<b>Figura 6:</b> Trombose pulmonar induzida em camundongos pela convulxina dos venenos de <i>C. d. terrificus</i> (A) e <i>C.d.cascavella</i> (B).....	25
<b>Figura 7:</b> Vasos pulmonares (com hemácias) - pulmões de animais injetados com: crotoxina obtida dos venenos de <i>C. d. terrificus</i> (A) e <i>C. d. cascavella</i> (B).	26
<b>Figura 8:</b> Vasos pulmonares (com hemácias) - pulmões de animais injetados com crotamina obtida dos venenos de <i>C. d. terrificus</i> (A) e <i>C. d. cascavella</i> (B)	27
<b>Figura 9:</b> Vasos pulmonares (com hemácias) - pulmões de animais injetados com: fração 3 obtida do veneno de <i>C. d. terrificus</i> .....	28
<b>Figura 10:</b> Pulmão de camundongo administrado com salina (controle).....	28
<b>Figura 11:</b> Relação entre a % de trombos evocados pelo tratamento com duas doses de convulxina. Diferentes tratamentos com drogas isoladas.....	31
<b>Figura 12:</b> Relação entre a % de trombos evocados pelo tratamento com a dose de 4 µg de convulxina. Doses isoladas e agrupadas.....	32
<b>Figura 13:</b> Relação entre a % de trombos evocados pelo tratamento com a dose de 8 µg de convulxina. Doses isoladas e agrupadas.....	33
<b>Figura 14:</b> Comparação entre os tratamentos mais efetivos nas doses de 4 µg e 8 µg de convulxina.....	34
<b>Figura 15:</b> Relação entre a % de trombos evocados pela convulxina (4 µg) e seu antagonismo pela heparina (100 UI/kg), dermatan (1 mg/kg) e associação..	35
<b>Figura 16:</b> Efeito inibidor da heparina (dose 12.500 UI/Kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina.....	36
<b>Figura 17:</b> Efeito inibidor da heparina + aspirina (12.500 UI/kg + 20 mg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina.....	36



<b>Figura 18:</b> Efeito inibidor da heparina + prostaciclina (12.500 UI/kg + 1 µg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina.....	37
<b>Figura 19:</b> Efeito inibidor da heparina (dose 100 UI/kg). sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina.....	37
<b>Figura 20:</b> Efeito inibidor da heparina + dermatan (100 UI/kg + 1 mg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina.....	38
<b>Figura 21:</b> Agregação plaquetária induzida pelos venenos de <i>C.d.terrificus</i> , <i>C.d.cascavella</i> e frações.....	39

## ***LISTAS DE TABELAS***

---

<b>Tabela 1:</b> Ações farmacológicas das drogas utilizadas.....	17
<b>Tabela 2:</b> Correlação entre aparecimento de sinais e sintomas e percentagem de trombos dos pulmões, retirados dos camundongos inoculados convulxina.....	29

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

ADP	difosfato de adenosina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AV	antiveneno
<i>C. d. cascavella</i>	veneno total <i>Crotalus durissus cascavella</i>
<i>C. d. terrificus</i>	veneno total <i>Crotalus durissus terrificus</i>
cx	convulxina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina-eosina
NaCl	cloreto de sódio
p62/GPVI	subtipo de receptor do colágeno
PAF	fator de ativação plaquetária
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	fosfolipase C
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
TRIS	hidroximetil aminometano
TXA <sub>2</sub>	tromboxano A <sub>2</sub>
PKC	proteína quinase C

## ***LISTA DE MATERIAIS***

---

<b>REAGENTE</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
Acrilamida	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA)
Azul brilhante de Comassie R250	Sigma
Bisacrilamida	Sigma
$\beta$ - mercaptoetanol	Sigma
Glicerol	Sigma
Proteínas padrões (p/eletroforese)	Sigma
Dextran	Sigma
Resina Sephadex G-75	Sigma
Formoldeído	Synth (Brasil)
Hematoxilina	Merck (Alemanha)
Eosina	Merck (Alemanha)
Iloprost (prostaciclina)	Schering (Alemanha)
Metronidazol	Rhodia (Brasil)
Veneno de <i>C. d.terrificus</i>	(já se encontrava no laboratório)
Veneno de <i>C. d. Cascavella</i>	Maranhão
Álcool absoluto	Synth (Brasil)
Xilol	Synth
Parafina	Paraplast (Brasil)
Lâmina	Knittel (Brasil)
Lamínulas	Knittel

1. The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

2. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

3. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

## **RESUMO**

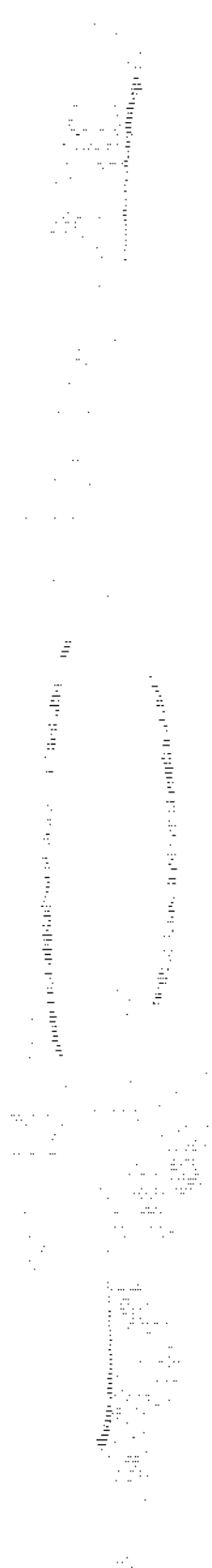
Este trabalho objetivou demonstrar que entre as toxinas crotálicas, só a convulxina é capaz de causar trombose pulmonar em camundongos e buscou, ao mesmo tempo, investigar o mecanismo pelo qual a convulxina produz a trombose pulmonar.

A convulxina, isolada tanto do veneno de *C. d. terrificus* como da *C. d. cascavella*, mostrou ser a única capaz de agregar plaquetas e evocar a formação de trombos em pulmões de camundongos.

Como não houve diferença entre o grau de trombose causado pela convulxina das duas subespécies, os resultados obtidos com cada uma, em separado, foram agrupados.

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na trombose, utilizamos não só os inibidores clássicos da agregação via tromboxano A<sub>2</sub> (AAS e Dazoxiben), como também a prostaciclina, capaz de elevar os níveis intracelulares de AMPc. Usamos também inibidores da trombina (heparina) e antagonistas ensaiados, anteriormente, na agregação e/ou broncoconstrição, induzidas pela convulxina (metisergida, mepiramina e metronidazol).

Os resultados obtidos levam-nos às seguintes conclusões: a convulxina, poderoso agente agregante plaquetário *in vitro*, induz à formação de trombos no pulmão de camundongos; tanto a heparina, como a aspirina, a prostaciclina e o dazoxiben mostraram-se capazes de inibir o efeito trombótico da convulxina, sozinhos ou em associação; a heparina potencializou os efeitos das demais drogas e o seu efeito antitrombótico foi potencializado pela associação com o dermatan. O modelo é autolimitado, pois não admite a possibilidade de aumento de dose da convulxina.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. PEÇONHAS

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas, principalmente, (70-90%) por proteínas (toxinas e/ou enzimas), carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos (DEVI, 1968; BIEBER *et al.*, 1990). Entre as múltiplas enzimas neles detectadas, algumas revelaram importância farmacológica. Dentre estas, destacam-se as proteases, a fosfolipases e a hialuronidase. Quando injetadas em animais, ou em humanos no caso de acidentes, (MEBS & OWNBY, 1990), produzem uma variedade de sintomas. Além de efeitos agudos, que podem representar uma ameaça à vida, como falência cardiovascular ou renal, choque e paralisia e outras manifestações, como edema hemorrágico e necrose local, afetam não só a pele, como também a camada muscular, causando, muitas vezes, incapacidade prolongada ou permanente. Alterações patológicas são observadas após injeção de vários venenos no tecido muscular, desde edema e hemorragia, até eventos degenerativos e graves processos miolíticos (HOMMA & TU, 1971; OWNBY *et al.*, 1982; MEBS, EHRENFELD, SAMEJIMA, 1983).

Estes efeitos podem ser indiretos, por meio da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, ou diretos, através de ações nas membranas celulares. Seus princípios ativos são proteínas de estrutura, ponto isoelétrico e peso molecular muito variável. Alguns podem encerrar, igualmente, polipeptídeos farmacologicamente ativos. Muitas proteínas dos venenos ofídicos exercem atividades enzimáticas.

## 1.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os acidentes ofídicos têm importância médica, em virtude do grande número de pessoas atingidas e pela própria gravidade que representam. No Brasil, das notificações de acidentes ofídicos (janeiro de 1990 a dezembro de 1993), informando o gênero da serpente, 90,5% eram do gênero *Bothrops*; 7,7%, *Crotalus*; 1,4%, *Lachesis* e 0,4%, *Micrurus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).



No Estado de São Paulo, nos anos de 1986 a 1990, observou-se a seguinte frequência: 86% com serpentes do gênero *Bothrops*; 12,9%, com *Crotalus* e 1,1%, com *Micrurus*. Não há relatos de acidentes por serpentes do gênero *Lachesis* no Estado de São Paulo (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES

No Brasil, as serpentes venenosas de importância médica pertencem às famílias *Elapidae* e *Viperidae* (subfamília *Crotalinae*). O único gênero da família *Elapidae*, no Brasil, é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais. Os representantes da subfamília *Crotalinae* pertencem aos gêneros *Crotalus*, *Bothrops* e *Lachesis*.

### 1.4. GÊNERO *CROTALUS*

No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado pela espécie *Crotalus durissus*, constituída por várias subespécies. As principais são: *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* (CAMPBELL & LAMAR, 1989), sendo que esta última é a de maior importância médica (ROSENFELD, 1971). As principais ações do veneno de *C. d. terrificus* são: neurotóxica (BRAZIL, 1966; BRAZIL & Excell, 1972); miotóxica (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 1987) e coagulante (ROSENFELD *et al.*, 1971; NAHAS, KAMIGUTI, BARROS, 1979). O principal componente tóxico do veneno de *C. d. terrificus* é a crotoxina, que corresponde a 50% ou mais do peso seco do veneno. Esta toxina, que foi inicialmente isolada e cristalizada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT em 1938, é o componente melhor caracterizado do veneno (BON *et al.*, 1989; BIEBER *et al.*, 1990). Trata-se de um heterodímero composto por uma subunidade ácida desprovida de atividade tóxica ou biológica (crotapotina), e uma subunidade básica com atividade fosfatidato2-acilhidrolase (fosfolipase A<sub>2</sub>, ou PLA<sub>2</sub>) (HENDON & FRANKEL-CONRAT, 1971) e de baixa toxicidade. Estes dois componentes, quando associados (como

é no caso do complexo nativo), apresentam uma potente ação neurotóxica pré-sináptica (BON *et al.*, 1989).

As demais toxinas conhecidas, têm-se mostrado extremamente úteis como instrumento de pesquisa; são elas a crotamina (GONÇALVES & VIEIRA, 1950) e a convulxina, (PRADO-FRANCESCHI, 1970). Outras, como a giroxina (BARRIO, 1954) e deltatoxina (VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI, 1968) precisam ser melhor estudadas.



**Figura 1:** *Crotalus durissus cascavella*

## 1.5. CONVULXINA

A convulxina é uma proteína de alto peso molecular que foi detectada por cromatografia em gel (Sephadex G-75 e G-100), no primeiro pico obtido no fracionamento da peçonha da cascavel sul-americana (*C.d.terrificus*, *C.d.cascavella* e *C.d.collilineatus*).

Após a administração, i.v., de convulxina verifica-se:

- Em animais não anestesiados, crises convulsivas com movimentos tônico-clônicos, seguidos de uma breve fase de hipotonia que se inicia 20 segundos após a injeção (PRADO-FRANCESCHI, 1970; PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981).

- Em animais anestesiados, imediatamente após a injeção, há modificações respiratórias caracterizadas por taquipnéia seguida de apnéia de curta duração e alterações circulatórias como hipotensão abrupta e, a seguir, hipertensão transitória (PRADO-FRANCESCHI, 1970; PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981). Além disso, ocorrem alterações no sangue periférico caracterizadas por plaquetopenia, com formação de microagregados plaquetários (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1981).

A convulxina é, em termos moleculares, um dos mais potentes agregantes conhecidos, sendo desprovida de atividades coagulante e enzimática (BRINKHOUS & SMITH, 1988; SMITH & BRINKHOUS, 1991).

A agregação induzida pela convulxina está ligada à formação de tromboxano por ativação de fosfolipase A<sub>2</sub>, liberação de ADP e ativação da fosfolipase C. A ação desta última leva à produção de inositol trifosfato e diaciglicerol, segundos mensageiros que aumentam o Ca<sup>2+</sup> intracelular e ativam a proteína quinase C (VARGAFTIG *et al.*, 1980; WAL, *et al.*, 1985; FAILI *et al.*, 1994).

EDTA e prostaciclina inibem a agregação plaquetária induzida pela convulxina, indicando que a resposta intracelular é Ca<sup>2+</sup> dependente e envolve o sistema adenilatociclase - AMP cíclico (VARGAFTIG *et al.*, 1980). A possibilidade de que os efeitos da convulxina sobre as plaquetas seja mediado por sua capacidade de ligar-se aos receptores do colágeno foi aventada por VARGAFTIG *et al.* (1983). SANO-MARTINS & DAIMON (1992) sugerem que o receptor ativado pela convulxina seja o mesmo da aglutinina de germe do trigo (WGA).

Os exames histológicos de órgãos de coelhos anestesiados que receberam uma DE<sub>50</sub> de convulxina (20 µg/kg) não revelaram seqüestração de plaquetas ou leucócitos capaz de explicar a trombocitopenia e leucocitopenia observadas (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1981).

Em pulmões de camundongos, não anestesiados, que haviam recebido uma DL<sub>50</sub> (500 µg/kg) e ido a óbito, durante crise convulsiva, detectou-se extensa trombose venosa (PRADO-FRANCESCHI, LOPES DE FARIA, LOBO DE ARAUJO, 1982). Como o exame do cérebro destes animais não mostrou quaisquer alterações morfológicas, a convulsão observada foi considerada de origem periférica, fato reforçado pelos resultados de MELLO *et al* (1989), demonstrando que a administração da convulxina intra-cerebral não promove qualquer efeito.

Segundo POLGÁR *et al.* (1997), que isolaram a convulxina a partir do veneno de *C.d.terrificus*, o subtipo de receptor do colágeno envolvido, seria o p62/GPVI e não o GPIb já que nem o anticorpo contra o GPIb, nem a equicetina, foram capazes de inibir a agregação induzida por convulxina.

Por outro lado, FRANCISCETTI *et al.* (1998) demonstraram que a ativação plaquetária induzida pela convulxina segue uma via tirosina-quinase dependente, razão pela qual tanto a stauroporina (inibidor de proteína quinase) como a genisteína (inibidor específico da tirosina-quinase) inibem de forma dose-dependente a agregação induzida pela convulxina.

## **1.6. HEMOSTASIA**

### **1.6.1. Hemostasia normal**

A natureza desenvolveu sistemas complexos para manter a fluidez do sangue no sistema vascular; entretanto sempre que um vaso é lesado ocorre a formação de um sólido tampão para evitar a perda sanguínea. Após a lesão vascular, seguem-se alguns eventos: breve período de vasoconstrição, a qual, nos pequenos vasos (principalmente nas arteríolas), serve para reduzir a perda de sangue; adesão de plaquetas às macromoléculas presentes nas regiões subendoteliais do vaso sangüíneo lesado, seguida de ativação por

contato, isto é, alteração na forma, uma reação de liberação e subsequente, agregação de mais plaquetas. Essa reação plaquetária ocorre dentro de minutos e é chamada de hemostasia primária.

Quase que simultaneamente, a liberação de fatores, no local da lesão e a exposição de componentes da parede vascular, em combinação com os fatores plaquetários ativam a sequência plasmática de coagulação, formando a fibrina. Isso exige um tempo mais longo para se completar e é chamado de hemostasia secundária. (Robbins, COTRAN, KUMAR, 1993).

### **1.6.2. Plaquetas, estrutura e funções**

Os aspectos morfológicos e funcionais das plaquetas foram revistos em 1970, por MUSTARD & PARKHAM e, mais recentemente, por HOURANI & CUSACK (1991). Desta última revisão, destacamos os pontos que consideramos mais importantes.

Plaquetas são estruturas derivadas da fragmentação citoplasmática de megacariócitos, possuem forma discóide e achatada com diâmetro de 1,5 a 3,5  $\mu\text{m}$ . São os menores elementos figurados do sangue, cuja vida média é de 7 a 10 dias. Apesar de não possuírem núcleo, as plaquetas contêm organelas e complexos moleculares comuns a outros tipos celulares, tais como mitocôndrias, sistema de Golgi, ribossomas e grânulos.

Possuem a membrana plasmática invaginada, formando um grande sistema canicular de superfície conectada, ocasionando um grande aumento da superfície celular. A associação da invaginação endoplasmática com o sistema tubular denso é similar à associação, em músculo esquelético, entre os túbulos transversais e o retículo sarcoplasmático (WHITE, 1972). Similaridade funcional também existe, pois o sistema tubular denso, como o retículo sarcoplasmático, é um sítio de estocagem de cálcio, que pode ser liberado durante a ativação da plaqueta (SKAER, PETERS, EMMINES, 1974).

As plaquetas possuem três tipos de grânulos: grânulos densos, grânulos  $\alpha$  e grânulos lisossomais. Os grânulos densos estão presentes nas plaquetas em pequeno número (ao redor de 5 por plaqueta). Estes grânulos contêm alta concentração de aminas biogênicas, principalmente 5-HT, ATP, ADP e  $\text{Ca}^{2+}$ . São os primeiros a serem liberados durante a ativação plaquetária. Algumas dessas substâncias são agregantes, atuam na ativação de outras plaquetas, podendo ainda afetar o tônus vascular.

Os grânulos  $\alpha$  aparecem em maior número. Neles estão armazenados o fator 4 plaquetário, b-tromboglobulina, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), proteínas catiônicas, fator quimiotático (responsável pela ativação do quinto componente do sistema complemento), fator bactericida e fatores que participam da cascata da coagulação (fibrinogênio, o fator V e o fator VIII/von Willebrand). Esses grânulos contêm também fibrinogênio, que participa da agregação, e é também substrato para a trombina, que o transforma em fibrina. Nos lisossomas, encontram-se algumas hidrolases ácidas, como a  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -galactosidase. O conteúdo dos lisossomas plaquetário é normalmente secretado pelas plaquetas (HOLMSEN & WEISS, 1979). Os grânulos densos apresentam-se negros, enquanto os grânulo  $\alpha$  e os lisossomais são morfologicamente indistinguíveis entre si.

A principal função das plaquetas é atuar na hemostase. São estes elementos que dão início ao processo hemostático, auxiliando a interrupção do extravasamento de sangue e a reparação das lesões nas paredes dos vasos sanguíneos.

A adesão das plaquetas à estrutura exposta da matriz endotelial, faz-se através da interação com várias glicoproteínas adesivas, tais como: fator de von Willebrand; fibronectina; vitronectina; trombospondina; colágeno e laminina (MACEVER, 1990). Estas proteínas contêm domínios reconhecíveis por receptores específicos da superfície plaquetária, o que permite sua interação com a matriz. A existência de muitos receptores para proteínas adesivas, fazem-nas muito eficientes no processo de adesão à matriz subendotelial. Após a adesão das plaquetas ao subendotélio, a ativação destes receptores altera o metabolismo plaquetário e induz secreção e agregação.

### **1.6.3. Agregação plaquetária**

A agregação plaquetária é mediada por pelo menos 3 diferentes mecanismos (KINLOUGH-RATHBONE *et al.*, 1977; PACKHAM *et al.*, 1977). O primeiro envolve a liberação de ADP (BORN, 1962a e 1962b) e, durante algum tempo, acreditou-se que este fosse capaz de mediar a agregação causada por todos os demais agentes agregantes.

Entretanto, o fato do ATP (um verdadeiro antagonista do ADP) não inibir a agregação induzida por outros agentes (MACFARLANE & MILLS, 1975) mostrou que

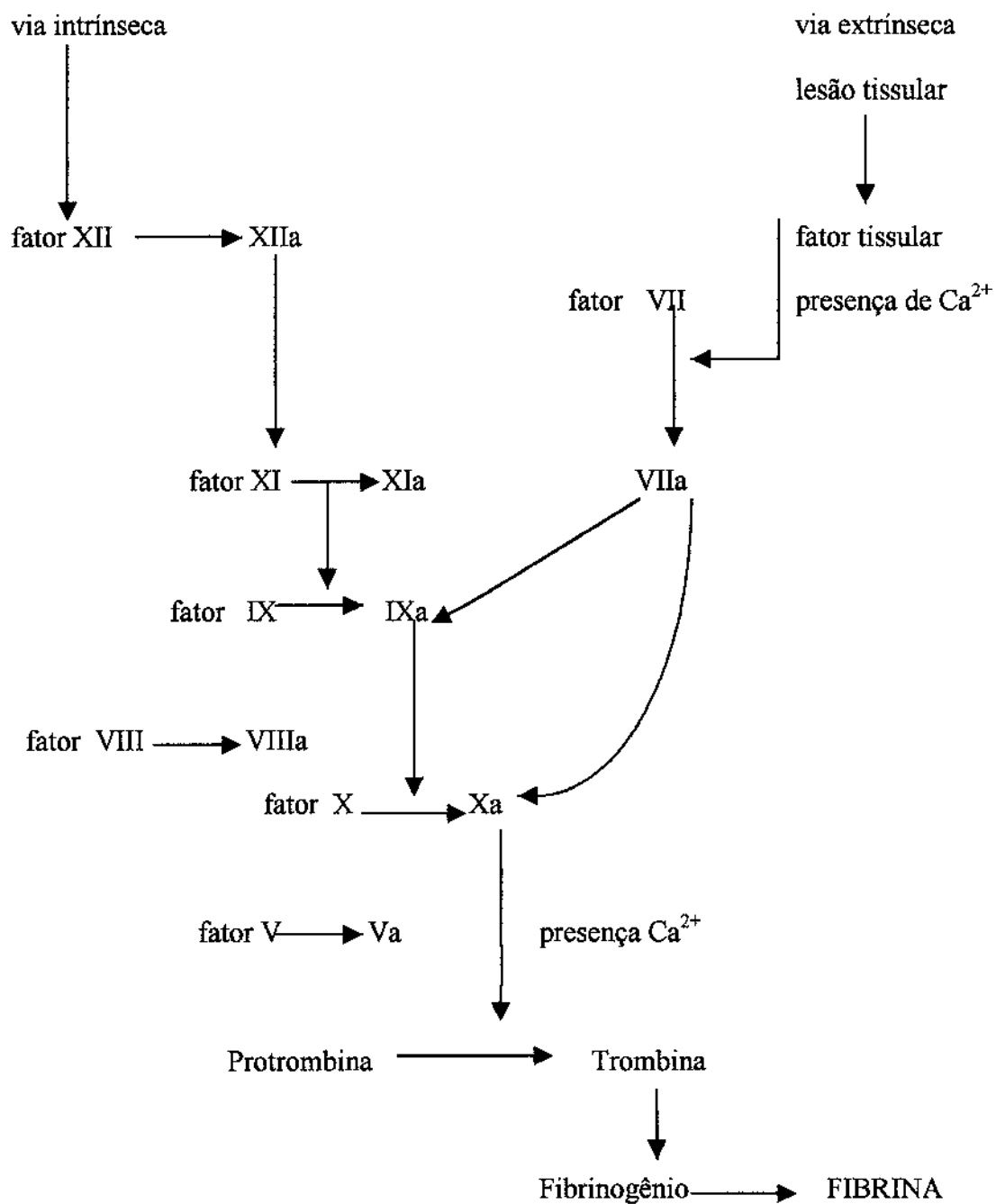
drogas podem induzir o processo por outros mecanismos que não a liberação de ADP. Além disso, a combinação de fosfato de creatina e creatina fosfoquinase (CP/PPK) que pode impedir a agregação induzida pelo ADP convertendo-o em ATP. O segundo mecanismo, mediado pelos metabólitos do ácido araquidônico (AA), particularmente o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) é deflagrado por potentes agentes agregantes como o tromboxano, colágeno, convulxina e pelo próprio ato de agregação (LONGENECKER, 1985a e 1985b, VARGAFTIG *et al.*, 1981), e pode ser bloqueado pela aspirina (AAS) pela inibição da via da ciclo-oxigenase (VARGAFTIG & ZIRINIS, 1973). No entanto, nem a inibição da via tromboxana (pela AAS) nem da via ADP (pelo CP/CPK), nem de ambas conjuntamente, mostrou-se capaz de inibir a agregação causada por altas concentrações de trombina ou ionoforo de cálcio (A 23187) ou convulxina (KINLOUGH- RATBONE *et al.*, 1977; PACKHAM *et al.*, 1977, VARGAFTIG *et al.*, 1980).

O PAF (fator ativador de plaquetas), uma lisofosfatidilcolina capaz de agregar plaquetas por uma via independente da ciclo-oxigenase (CHIGNARD *et al.*, 1979) foi postulado como mediador desta 3ª. via. Entretanto, nem a utilização de antagonistas seletivos do PAF, nem a prévia depleção do conteúdo granular de plaquetas (ADNOT, JOSEPH, VARGAFTIG, 1987), são capazes de impedir a posterior agregação plaquetária induzida, utilizada pela convulxina ou pela trombina.

A serotonina (5-HT) agrega plaquetas humanas em concentrações micromolares (µM), mas este efeito (como outros desta amina) é variável e, de forma geral, reversível e dependente de espécie animal (MITCHELL, 1975). O receptor para 5-HT está ligado à ativação da PLAC e de sua ativação resulta a quebra do fosfoinosotídeos, aumento de Ca<sup>2+</sup> e fosforilação.

#### **1.6.4. Coagulação**

A cascata da coagulação é uma cascata de enzimas proteolíticas. Os precursores inativos são ativados em série, cada um originando o seguinte. A última enzima trombina, derivada da protrombina (II), converte o fibrinogênio solúvel, em rede insolúvel de fibrina no qual as células sanguíneas são aprisionadas, formando o coágulo. Existem duas vias na cascata: a via intrínseca e a via extrínseca .



**Figura 2: Cascata da coagulação**



A via intrínseca começa quando o sangue entra em contato com a superfície vascular endoteliza, da carregado negativamente. O fator XII é ativado, e, em reação sequencial, os fatores VI e IX são ativados. Na superfície plaquetária, os fatores IXa e VIII interagem com o cálcio e ativam o fator Xa. Na via extrínseca, o fator tissular é liberado após a lesão parietal vascular ativar o fator VII, que, por sua vez, ativa o fator X. Depois, na superfície plaquetária, os fatores Xa e Va interagem com o cálcio e catalisam a conversão da protrombina em trombina. A trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina e ativa o fator XIII; que, por sua vez, é convertido em polímeros de fibrina no coágulo em desenvolvimento (Davie, FUJIKAMA, KISIEL, 1991).

#### **1.6.5. Mecanismos anticoagulantes naturais**

A ativação das plaquetas e coagulação, normalmente, não ocorrem em um vaso sanguíneo íntegro. A trombose é evitada por vários mecanismos reguladores que exigem um endotélio vascular normal (Esmon, 1987). A prostaciclina ( $PGI_2$ ), um metabólito do ácido araquidônico, é sintetizada por células endoteliais e inibe a agregação e secreção plaquetárias. A anti-trombina é uma proteína plasmática que inibe os fatores de coagulação pelas diferentes vias. Os proteoglicanos, como o sulfato de heparan, encontrados na superfície endotelial estimulam a atividade da antitrombina. A proteína C, é um zimogênio plasmático que é homólogo aos fatores II, VII, IX e X e a sua atividade depende da ligação de  $Ca^{2+}$  a resíduos Gla em seu domínio amino-terminal. A proteína C ativada em combinação com seu co-fator não-enzimático contendo Gla (proteína S), degrada os fatores Va e VIIIa e, assim, diminui bastante a velocidade de ativação protrombina e do fator X. A proteína C é ativada pela trombina apenas na presença de trombomodulina, uma proteína integrante da membrana de células endoteliais. Como a anti-trombina, a proteína C exerce um efeito anticoagulante nas proximidades das células endoteliais íntegras. O inibidor da coagulação, associado à lipoproteína (LACI), é encontrado na fração lipoprotéica do plasma. Quando o LACI está ligado ao fator Xa, inibe o fator Xa e o complexo fator tecidual-fator VII. Por meio deste mecanismo, o fator Xa regula sua própria produção. (MAJERUS *et al.*, 1991)

### 1.6.6. Trombose

O trombo é formado por um processo complexo, envolvendo a interação da parede dos vasos sanguíneos, elementos constituintes do sangue, notadamente de plaquetas, e componentes plasmáticos que constituem o sistema sanguíneo de coagulação. Em contraste, o coágulo de sangue envolve somente a sequência de coagulação. Os trombos que surgem na circulação cardíaca ou arterial de rápida movimentação são compostos em grande parte de fibrina e plaquetas e, assim, têm pouca semelhança com o coágulo de sangue.

A trombose é, até certo grau, uma extensão patológica do mecanismo hemostático normal; depende não só da parede vascular com o seu revestimento endotelial e tecidos conjuntivos subendoteliais; como também plaquetas que são essenciais para a formação do trombo. Proteínas solúveis presentes no plasma e certas células em formas inativas, participam ainda, interagindo com os demais fatores numa sequência conhecida como cascata que termina num produto insolúvel, a fibrina (ROBBINS *et al.*, 1993).

### 1.6.7. Venenos e hemostasia

Muitos fatores extraídos de venenos, capazes de atuar sobre plaquetas e mecanismos hemostáticos já foram isolados. De três revisões, de BRINKHOUS & SMITH, 1988; SMITH & BRINKHOUS, 1991, e MARLAND, 1998, selecionamos os aspectos relacionados ao presente trabalho.

Em 1970, em sua tese de doutorado, Prado-Franceschi descreveu um potente ativador de plaquetas, isolado de *Crotalus durissus terrificus*. A substância foi chamada de convulxina (VITAL BRAZIL *et al.*, 1967) baseada na observação de que injeções intravenosas da substância, em camundongos, causavam apnéia transitória e convulsões. Vale ressaltar que MARKWARDT (1966) já havia identificado a capacidade liberadora de aminas e ativação plaquetária neste veneno. A convulxina foi subsequenteiramente isolada de três subespécies de *C. durissus* a saber: *terrificus*, *collilineatus* e *cascavella*. Quando a

convulxina é filtrada em Sephadex G-75, está presente no “void volume” o que indica um PM maior do que 80 K dáltons.

MARLAS *et al* (1982, 1983a, 1983b) estudaram a convulxina do ponto de vista bioquímico, caracterizando-a como uma glicoproteína solúvel em ácido com PM de 144 kDa e 300 kDa em pH ácido. Por dissociação em uréia 6N, uma forma menor de PM 72 Kda foi isolada. Por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, duas subunidades presentes em igual proporção com pesos moleculares de 12,5 e 13,5 kDa foram identificadas. Estes dados foram posteriormente confirmados por FRANCESCHITTI (1997) e no presente trabalho.

A atividade agregante da convulxina foi ensaiada em PRP de cobaia e de coelho e plaquetas lavadas (VARGAFTIG *et al.*, 1980; PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1981) e demonstrou-se a atividade trombótica da convulxina foi demonstrada pela primeira vez em 1982 (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1982).

### **Objetivos:**

Os objetivos deste trabalho foram:

(a) demonstrar que entre as toxinas crotálicas, só a convulxina é capaz de causar trombose pulmonar em camundongos;

(b) investigar o mecanismo pelo qual a convulxina produz trombose pulmonar.

## ***2. MATERIAIS E MÉTODOS***

## 2.1. ESTUDOS BIOQUÍMICOS

**Cromatografia em coluna:** O veneno de *C. d. terrificus* ou de *C. d. cascavella* (200 mg) foi dissolvido em tampão formato de amônio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 3,5. Em seguida, foi aplicado a uma coluna (1,6 cm x 98 cm) de Sephadex G-75 previamente equilibrada a 18°C com o mesmo tampão. A coluna foi eluída com o tampão acima a um fluxo de 30 ml/h e frações de 3,0 ml foram coletadas, usando-se um coletor modelo Ultrarac II 2070 da LKB (Uppsala, Suécia). O perfil da eluição foi determinado mediante a leitura das frações à 280 nm num espectrofotômetro Uvikon 810 UV/ Vis da Kontron. Subseqüentemente, foram concentrados os tubos referentes aos principais picos ou frações (F I, F II, F III e F IV do *C. d. terrificus* e F I, F II, F III e FIV do *C. d. cascavella*). A fração I referente à convulxina foi dializada, liofilizada e recromatografada na mesma coluna, nas mesmas condições descritas acima.

**Eletroforese:** A eletroforese foi feita em minigéis (10 cm x 8 cm) de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (HAMES, 1990), usando-se sistema descontínuo em placa vertical (Mighty Small II, Bio-Rad, São Francisco, CA, EUA). O gel de resolução, com concentração de poliacrilamida de 10%, foi preparado sob um gel de empacotamento de 4% de acrilamida.

A convulxina foi diluída em tampão (Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8), contendo SDS 10%, glicerol 5% e azul de bromofenol 5% (condições não redutoras). Em alguns casos foi acrescentado  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (condições redutoras). Após fervuras durante 5 min., alíquotas de 15  $\mu$ l (18  $\mu$ g) foram aplicados ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com voltagem fixada em 100 V, até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel (aproximadamente 2,5 h). Para a estimativa do peso molecular da convulxina, foi corrida paralelamente uma amostra de proteínas de pesos moleculares conhecidos (SVASTI & PANIJAN, 1977).

Após a corrida eletroforética, fez-se a coloração com solução de azul brilhante de Coomassie R 0,025%, em ácido acético 10%. Após a coloração, o excesso de corante foi retirado, lavando-se o gel com uma solução de etanol:ácido acético:água (30:10:60, v/v). O gel então foi seco, segundo a técnica de JUANG, CHANG, SUNG (1984) e fotografado.

## 2.2. ESTUDOS FARMACOLÓGICOS:

A determinação da DE<sub>50</sub> (efeito considerado: a formação de trombos) dos venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e a convulxina de ambos, foi realizada em camundongos de 20 g. Usou-se a via intravenosa.

As doses para os venenos totais e para convulxina de ambas as peçonhas variaram de 10 µg até 1000 µg/kg. Os efeitos foram observados desde o momento da injeção até a recuperação dos animais (30 min.). Registraram-se os sinais e sintomas observados.

As outras frações obtidas do fracionamento dos venenos, foram injetados i.v. em camundongos (20 g), na dose de 10 µg/animal para todas as frações.

Animais (n=8) foram pré-tratados por via intravenosa com heparina (100 e 12.500 UI/kg), sulfato de dermatan (1 mg/kg), aspirina (20 mg/kg), dazoxibem (60 mg/kg), prostaciclina (1 µg/kg), metisergida (1 mg/kg) e mepiramina (0,5 mg/kg). Após 30 ou 50 min., todos os animais receberam a convulxina nas doses 200 ou 400 µg/kg. Um outro grupo foi pré-tratado por via oral com metronidazol (1 g/kg) e, após 50 min., foi injetado com a convulxina nas doses 200 ou 400 µg/kg (veja as ações das drogas na tabela 1). Grupos diferentes receberam convulxina proveniente tanto de *C. d. terrificus* como de *C. d. cascavella* (controles). Os pulmões desses animais foram retirados após 30 min. para histologia.

**Tabela 1: Ações farmacológicas das drogas utilizadas**

<b>DROGAS</b>	<b>AÇÕES FARMACOLÓGICAS</b>
Aspirina	bloqueia produção de TXA <sub>2</sub>
Dazoxiben	bloqueia produção de TXA <sub>2</sub>
Dermatan	antitrombótico
Heparina	anticoagulante
Mepiramina	anti-histamínico
Metisergida	inibe os efeitos da 5-HT
Metronidazol	capaz de inibir agregação induzida pelo ADP e colágeno (Prado-Franceschi & Edson Antunes, 1989)
Prostaciclina	ativação AMPc

### **2.3. ESTUDO HISTOLÓGICO:**

Os tecidos para cortes histológicos foram fixados em formalina 10%, emblocados em parafina e corados pelo HE. As lâminas foram visualizadas por microscopia óptica comum. Para determinar a percentagem de trombos presentes, foi feita uma contagem de luzes vasculares com e sem trombos, sob objetiva de 40X. Foram contadas 50 luzes por lâmina. O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\frac{VT}{VO + VT} = \%VT$$

onde VT= luzes vasculares com trombo e VO= luzes vasculares sem trombo.

### **2.4. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação, durante os 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em citrato trisódico 3,8% (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do

sangue total a 200 g, em temperatura ambiente por 15 min. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000 g, em temperatura ambiente por 15 min., para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

A agregação foi monitorada, usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). O aparelho foi calibrado para 0% e 100% de transmissão de luz, usando PRP e PPP (ou solução de Krebs), respectivamente. O teste foi iniciado pela adição de agonista (ADP 10  $\mu$ M em PRP) ou veneno a 0,5 ml de suspensão de células e a agregação monitorada durante pelo menos 3 min.

Foram usados como agonistas os venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* (na dose de 2  $\mu$ g/ml). As frações resultantes no fracionamento de ambas as peçonhas, foram ensaiadas nas mesmas doses utilizadas para os venenos. Quanto à convulxina obtida dos venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella*, o efeito agregante foi testado de 6 ng até 1000 ng/ml.

## 2.5. COAGULAÇÃO:

O sangue de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação durante os 10 dias que antecederam o experimento foi colhido em citrato trisódico 3,8% (9:1, v/v). As amostras de sangue foram centrifugadas à 3000 RPM por 20 minutos para se obter plasma pobre em plaquetas (PPP). Os venenos brutos e convulxina (150 ng), 37,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  (ambos em 0,15 ml de volume) e 0,1 ml de PPP (previamente incubado à 37°C) foram incubados por 3 min. (tempo necessário para estabilização da temperatura). Neste mesmo instante, o cronômetro foi disparado, sendo o tubo agitado de 30 em 30 segundos, até a formação do coágulo. Fez-se um controle sem veneno para determinação do tempo normal de coagulação, e um controle utilizando-se veneno de *Bothrops jararaca* (OLIVEIRA, 1977) como controle positivo.



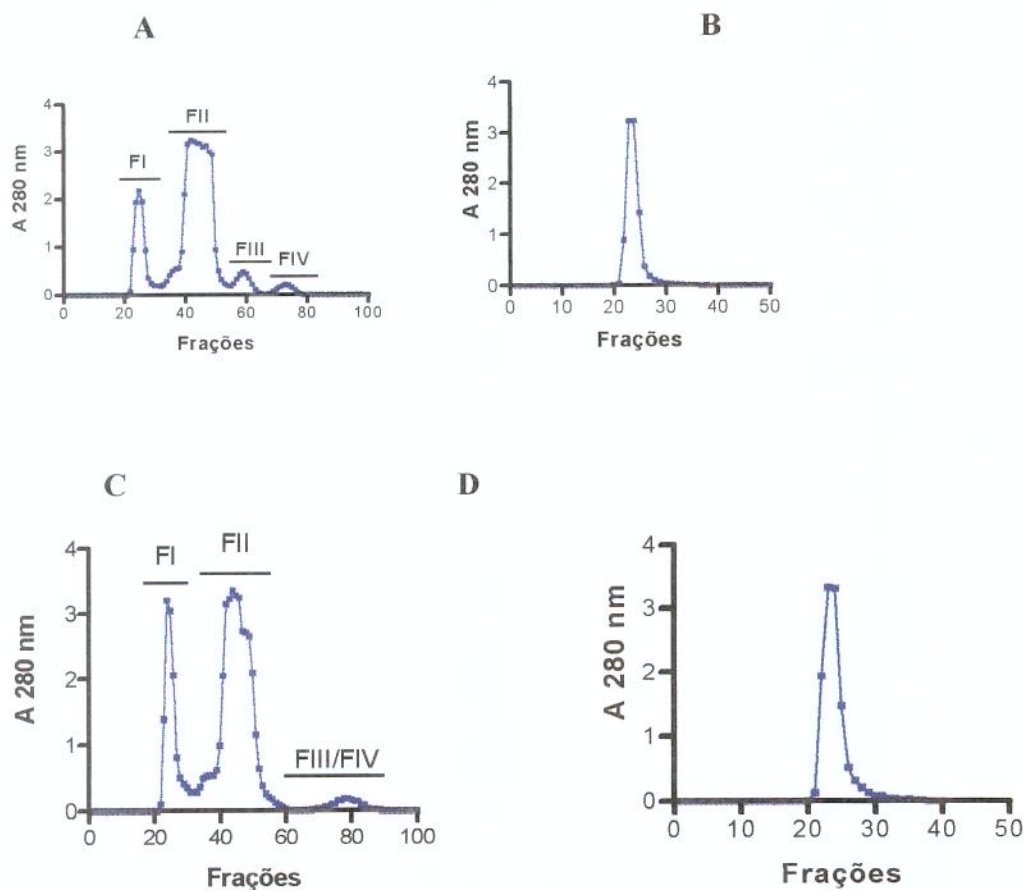
## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias (MES). Para comparações múltiplas de variáveis independentes, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Bonferroni não pareado e, para análise de dados entre o mesmo grupo foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Bonferroni pareado. Os cálculos e as comparações foram feitos usando o software Graphpad Instat, versão 4.0 (Software US). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3. RESULTADOS

### 3.1 ESTUDOS BIOQUÍMICOS

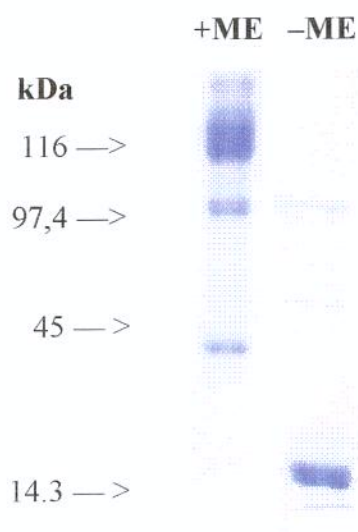
**Cromatografia:** As figuras 3 A-D, mostra a purificação da convulxina do veneno da *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella*, presente no primeiro pico do fracionamento (por gel de filtração) em coluna Sephadex G-75, em tampão formato de amônio 0,05 M pH 3,5, contendo NaCl 0,15 M. A fração I concentrada, dializada e liofilizada foi submetida a um segundo fracionamento, na mesma coluna e nas mesmas condições, resultando em um só pico que é a convulxina.



**Figuras 3:** A e B, veneno e convulxina de *C. d. terrificus*, respectivamente. C e D, veneno e convulxina de *C. d. cascavellas*, respectivamente. Os venenos e a fração I de cada veneno foram fracionados em coluna de Sephadex G-75, em tampão formato de amônio 0,05M pH 3,5, contendo NaCl 0,15M. Frações de 3,0 ml foram coletadas em um fluxo de 30ml/h.

## Eletroforese

A figura 4 mostra o perfil eletroforético da convulxina do veneno de *C. d. terrificus* em gel de SDS, no qual se observa a presença de 1 banda complexa com PM maior do que 116 kDa e outra em torno de 45 kDa. Após redução, por adição de  $\beta$ -mercaptoetanol, observa-se a presença de duas bandas de 13.5 kDa e 12.5 kDa, respectivamente. A convulxina obtida de *C. d. cascavella* apresentou o mesmo perfil (não mostrado).



**Figura 4:** Perfil eletroforético da convulxina da peçonha de *C. d. terrificus* em gel de poliacrilamida (10%) com SDS. Aplicaram-se 18  $\mu$ g da toxina preparada na ausência (-ME) e presença (+ME) de  $\beta$ -mercaptoetanol (16%). As proteínas marcadoras de peso molecular foram  $\beta$ -galactose (116 kDa), fosforilase b (97,4 kDa) e lisosima (14,3kDa).

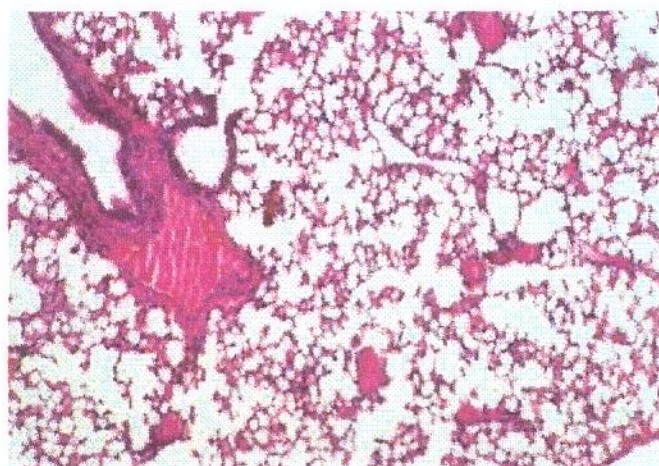
### 3.2. ESTUDO HISTOLÓGICO E FARMACOLÓGICO

Os sinais e sintomas observados a partir do momento da injeção da peçonha (8 a 20 µg/animal), foram movimentos pendulares da cabeça do animal, breves crises de apnéia, quedas lateralizadas seguidas ou não de crises convulsivas (com movimentos tônicos e clônicos).

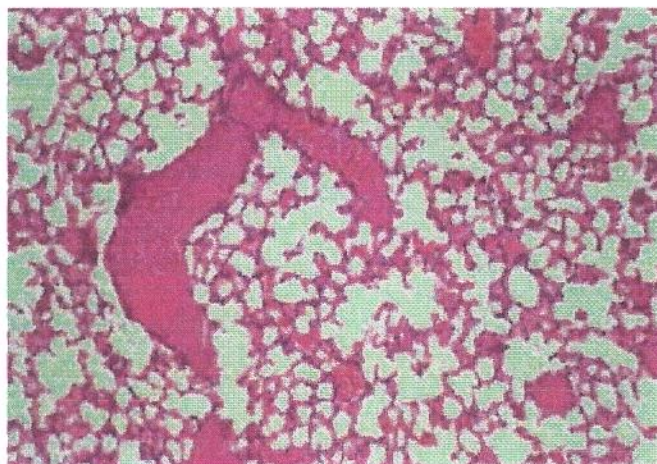
A correlação existente entre os sinais/sintomas e presença de trombos foi a mesma, tanto para o veneno de *C. d. terrificus* como o de *C. d. cascavella*. Assim, os camundongos que receberam doses de 1,25 µg e 2,5 µg, não apresentaram nem sinais ou sintomas após a injeção i.v., nem trombose pulmonar após exame histológico. No grupo em que os animais receberam 5 µg e nos quais houve ocorrência de trombos (figuras 5 a e b), observamos o aparecimento de apnéia curta e queda lateral do animal. No grupo dos animais inoculados com 10 e 20 µg, todos apresentaram apnéia prolongada e trombose pulmonar, sendo que os da dose de 20 µg morreram após a apnéia prolongada. A DE<sub>50</sub> (efeito considerado presença de trombos) para ambas as peçonhas foi de 5 µg/animal.

Em relação à convulxina, os sinais e sintomas iniciaram-se com movimentos pendulares da cabeça, aos quais se seguem quedas lateralizadas, apnéia intermitente que pode ser prolongada ou curta, seguidas ou não de breves crises convulsivas, que podem levar à morte. Os pulmões dos animais injetados com a convulxina exibiram trombose pulmonar rica em fibrina (figs. 6 a e b). Entretanto, os animais injetados com fração II (crotoxina; figs. 7 a), fração III (fig. 9) e fração IV (crotamina; fig. 8 a) da peçonha de *C. d. terrificus*, e fração II (crotoxina; fig. 7 b) e fração IV (crotamina; fig. 8 b) da peçonha de *C. d. cascavella*, não exibiram nenhuma alteração, nas doses 10 µg/animal e com as técnicas empregadas. Os cortes provenientes do grupo-controle que recebeu salina (i.v.) mostraram uma estrutura normal e sem nenhuma alteração aparente (fig. 10).

**A**



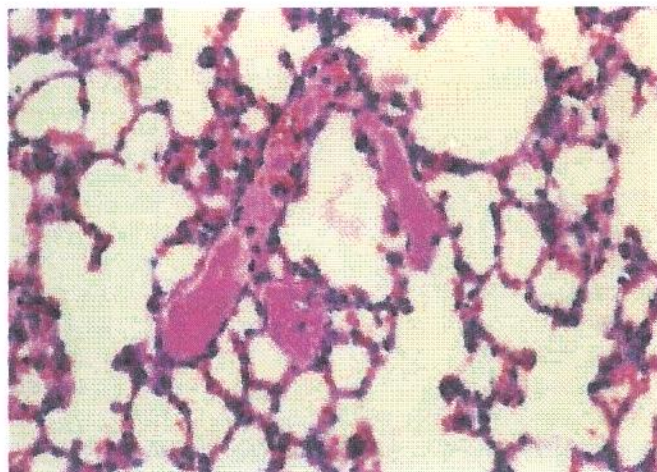
**B**



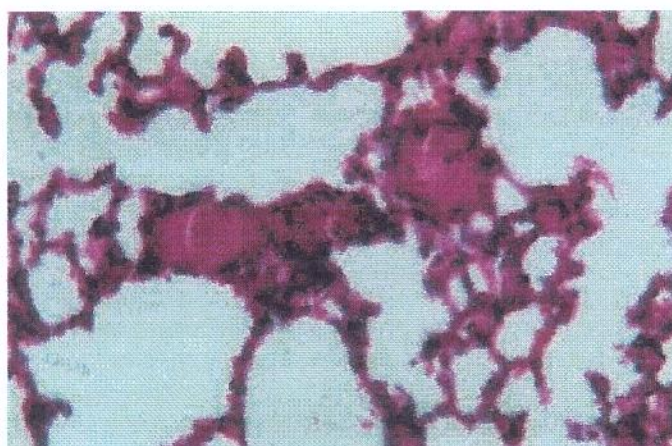
**Figura 5:** Trombose pulmonar induzida pelo veneno total de *C. d. terrificus* (A) e *C. d. cascavella* (B). Foram injetados 5  $\mu$ g de veneno/camundongo. Note-se que a maior parte dos vasos estão com trombos (200x, coloração HE).



A

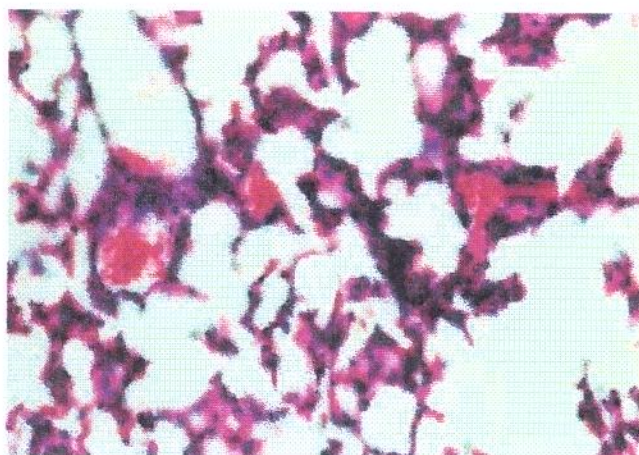


B

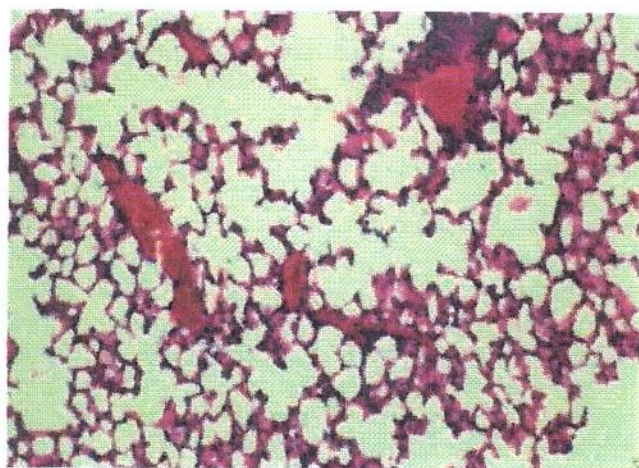


**Figura 6:** Trombose pulmonar induzida pela convulxina obtida pelo fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* (A) e de *C. d. cascavella* (B). Foram injetados 4  $\mu$ g/camundongo (400x, coloração HE).

A



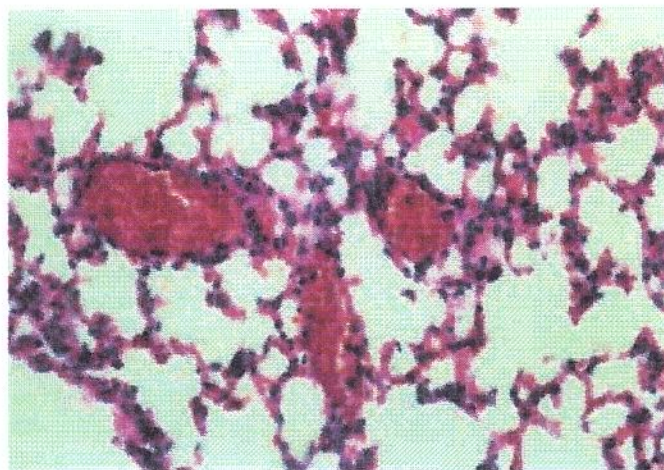
B



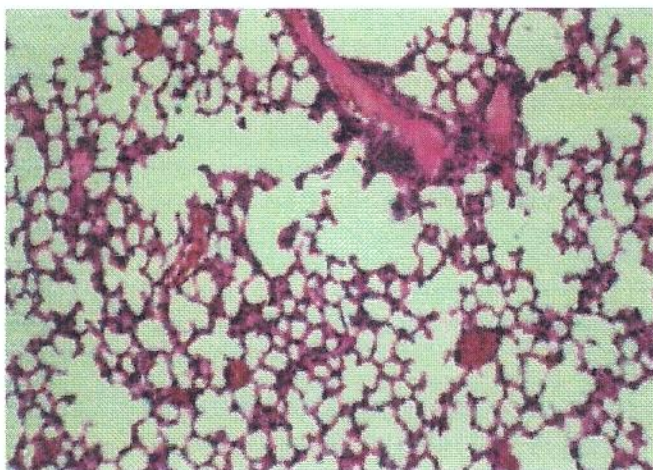
**Figura 7:** Crotoxina obtida pelo fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* (A) e de *C. d. cascavella* (B). Foram injetados 10 µg/camundongo, mostrando os vasos pulmonares com hemácias (400x, coloração HE).



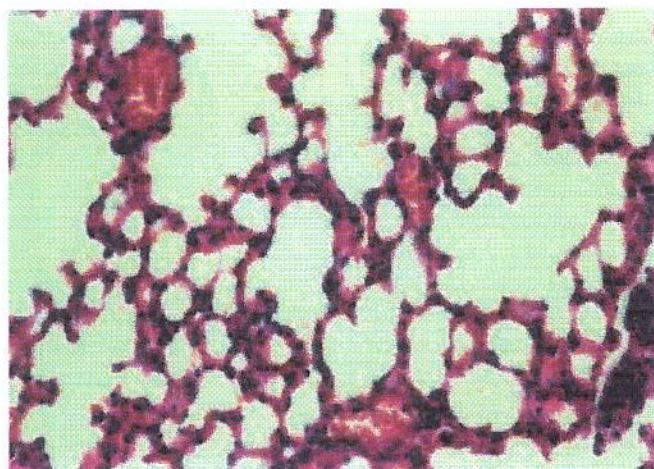
A



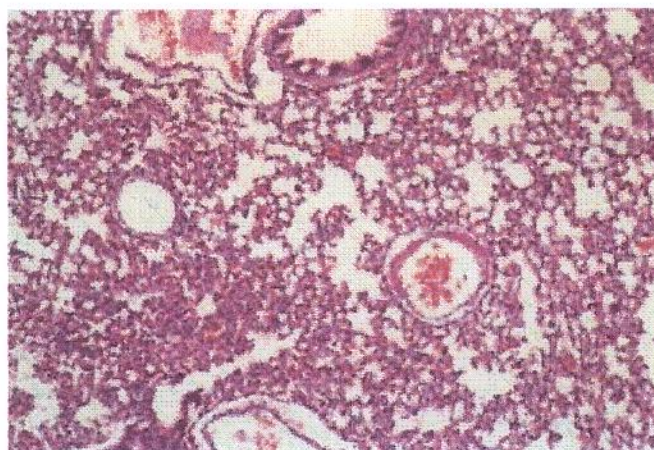
B



**Figura 8:** Crotamina obtida do fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* (A) e de *C. d. cascavella* (B). Foram injetados 10 µg/camundongo, mostrando os vasos pulmonares com hemácias (400x, coloração HE).



**Figura 9:** Trombose induzida pela fração 3, obtida pelo fracionamento do veneno de *C. d. terrificus*. Foram injetados 10 µg/camundongo. Note-se a presença dos vasos pulmonares com hemácias (400x, coloração HE).



**Figura 10:** Pulmão de camundongo administrado com salina (controle), mostrando a estrutura histológica normal como se observa em microscopia óptica comum (200x, coloração HE).

Os sinais e sintomas observados no animal íntegro foram, após administração intravenosa da convulxina de ambas as peçonhas, correlacionados com os achados histopatológicos observados no pulmão. As percentagens de trombos formados, pela administração da convulxina de 10 a 1000 µg/kg de animal estão apresentadas na tabela 2.

A DE<sub>50</sub> (efeito considerado: presença de trombo) nos pulmões, determinada com a administração de convulxina isolada de *C. d. terrificus* ou de *C. d. cascavella* foi de 100 µg/kg.

As doses de convulxina escolhidas para a realização dos testes com os antagonistas foram 2 e 4 DE<sub>50</sub>, respectivamente, 4 e 8 µg/animal, que ainda se encontram abaixo da DL<sub>50</sub>. Doses maiores inviabilizam o modelo, por levarem os animais à morte.

**Tabela 2:** Correlação entre o aparecimento de sinais e sintomas e porcentagem de trombos dos pulmões retirados dos camundongos inoculados pela convulxina.

Convulxina µg/kg	Trombos (%)	Sinais e sintomas
1000	52 ± 4,3 *	Movimentos pendulares da cabeça, queda lateralizada, apnéia prolongada, convulsão e morte.
500	64 ± 3,4	Movimentos pendulares da cabeça, queda lateralizada, apnéia intermitente, seguida de recuperação em 50% dos animais.
400	66 ± 3,2	Movimentos pendulares da cabeça, queda lateralizada, apnéia e recuperação de todos os animais.
200	56 ± 4,0	Queda lateralizada
100	36 ± 3,0	Ausência de efeitos
40	10 ± 2,2	Ausência de efeitos
20	4 ± 1,7	Ausência de efeitos
10	0	Ausência de efeitos

A presença de trombo foi determinada pela análise de 50 luzes em cortes de tecido pulmonar de camundongos (8 animais por dose). Os resultados estão apresentados como média ± DP.

\* p < 0,005 em relação ao 400 µg/kg.

### **3.3. EFEITO DE DIVERSAS DROGAS NA TROMBOSE PULMONAR INDUZIDA PELA CONVULXINA**

Os pulmões dos animais pré-tratados com metronidazol (1 g/kg), mepiramina (0,5 mg/kg), metisergida (1 mg/kg), apresentaram a trombose pulmonar característica. A determinação do efeito protetor da heparina (100 e 12.500 UI/kg), sulfato de dermatan (1 mg/kg), aspirina (20 mg/kg), prostaciclina (1 µg/kg) e dazoxiben (60 mg/kg) sobre a trombose induzida pela convulxina está ilustrada nas figuras que se seguem .

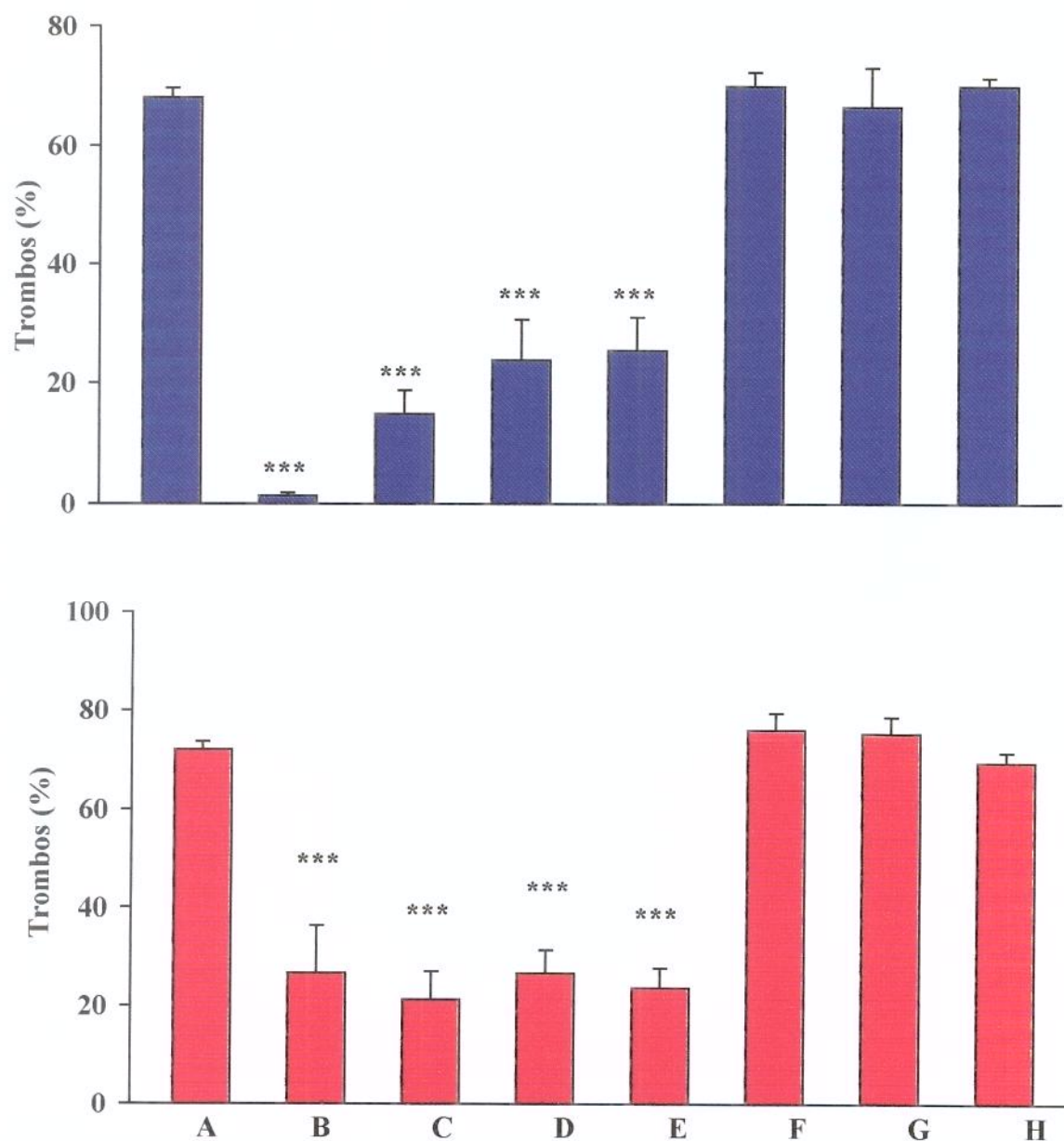
Inicialmente, apresentamos os tratamentos efetivos ( $p < 0,001$ , em relação ao controle-convulxina) quanto à percentagem de trombos evocada pela administração de convulxina (4 e 8 µg/animal) como se vê na figura 11.

As associações das drogas efetivas é mostrada nas figuras 12 e 13. Neste caso, a significância determinada em relação a cada tratamento farmacológico isolado mostrou que a heparina aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$  em relação à aspirina e  $p < 0,001$  em relação à prostaciclina e dazoxiben) a eficácia de todas as drogas, na prevenção da trombose, induzida por 4 µg de convulxina (fig. 12). No caso dos efeitos causados pela dose de 8 µg, houve diferença significativa apenas para a potencialização do efeito protetor da aspirina pela heparina ( $p < 0,01$ ).

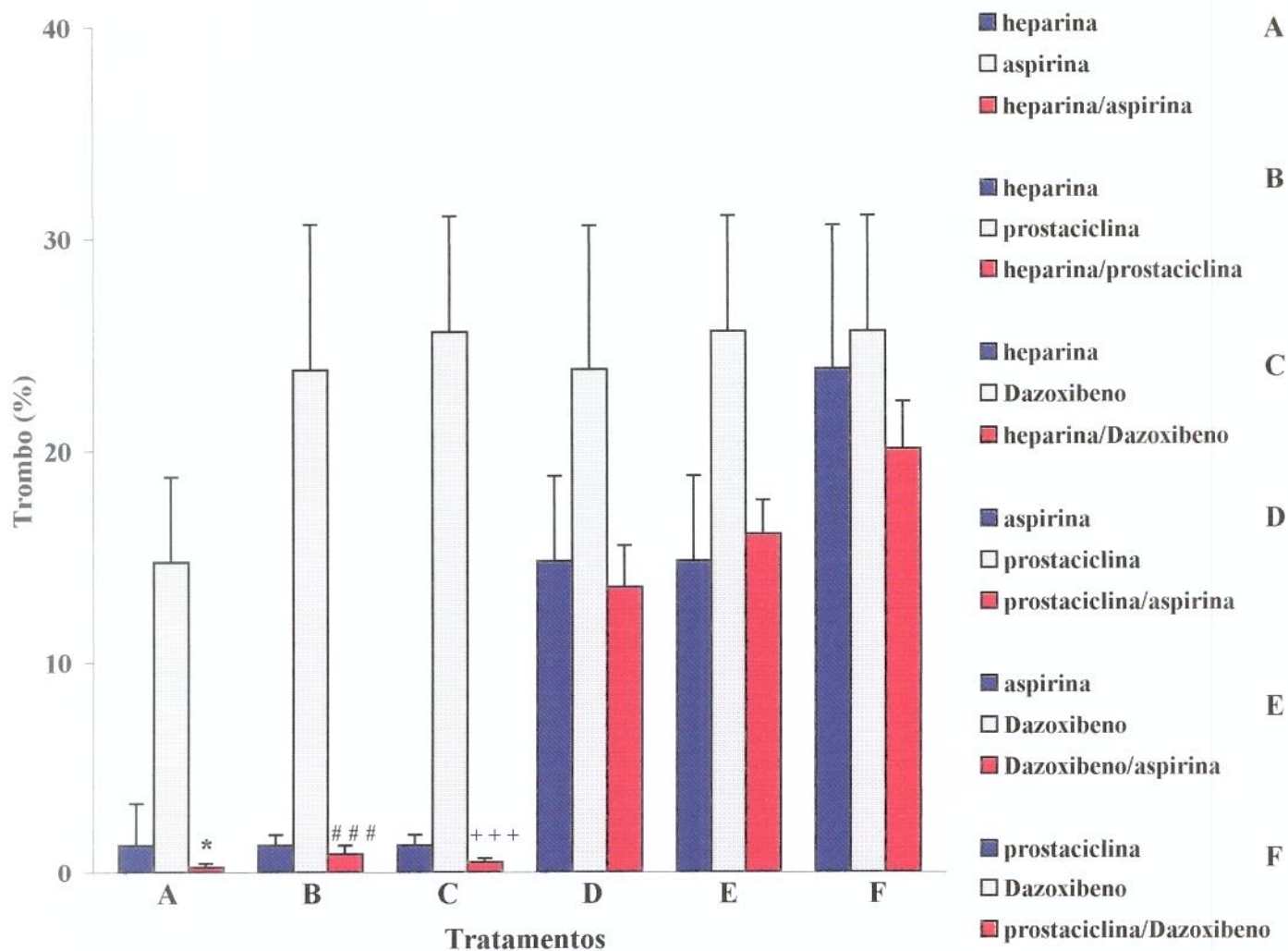
As diferenças observadas na eficácia das drogas em relação à dose da convulxina sugeriu a necessidade de compararmos as drogas mais efetivas em relação à dose de convulxina para mostrar que com o aumento de dose ocorre uma tendência para diminuição da proteção. No caso da heparina, essa diminuição foi significativa ( $p < 0,05$ , mostrado na figura 14).

Finalmente, na figura 15 observamos os efeitos da heparina, do dermatan e da associação de ambos. A associação foi mais efetiva do que a heparina isolada ( $p < 0,5$ ).

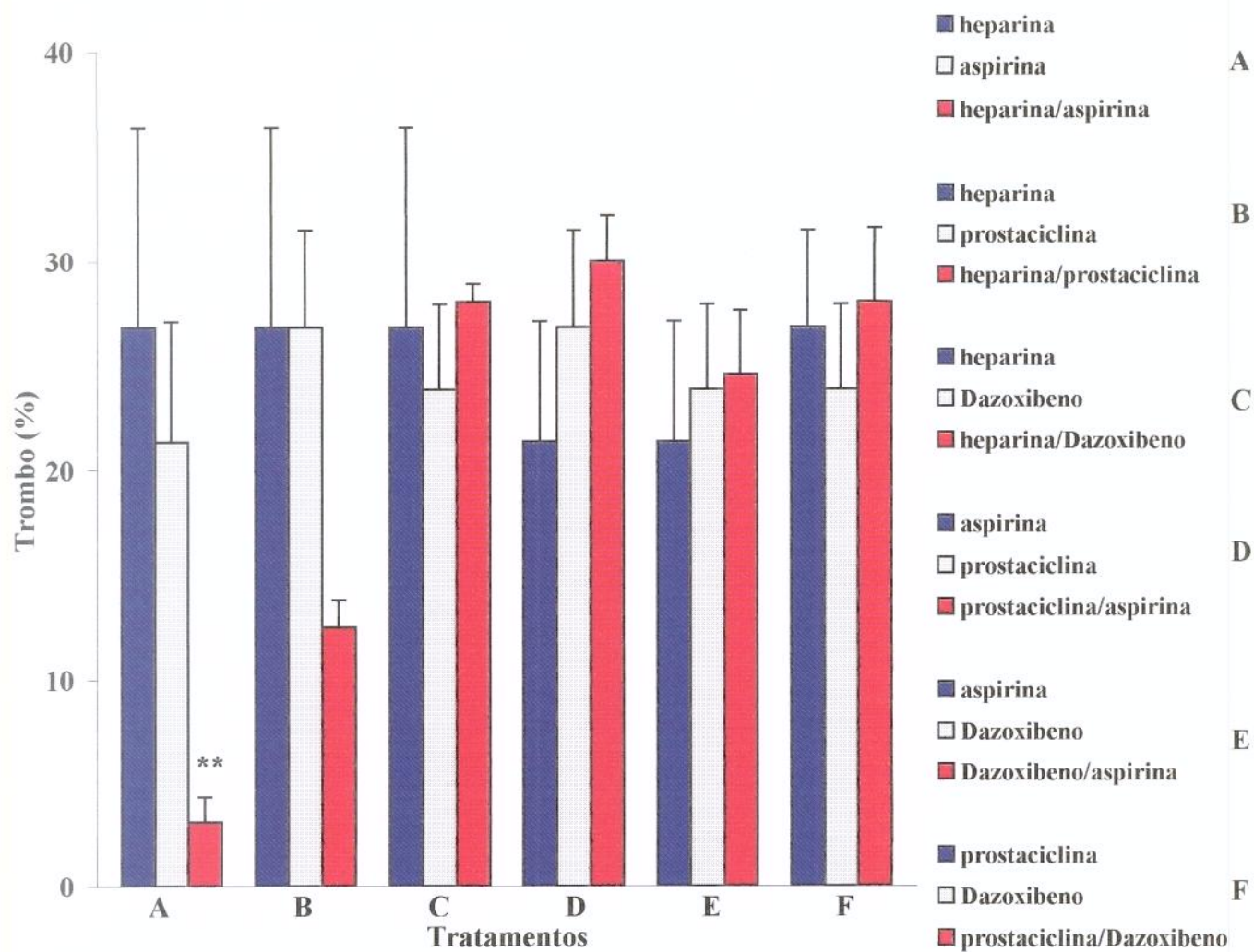




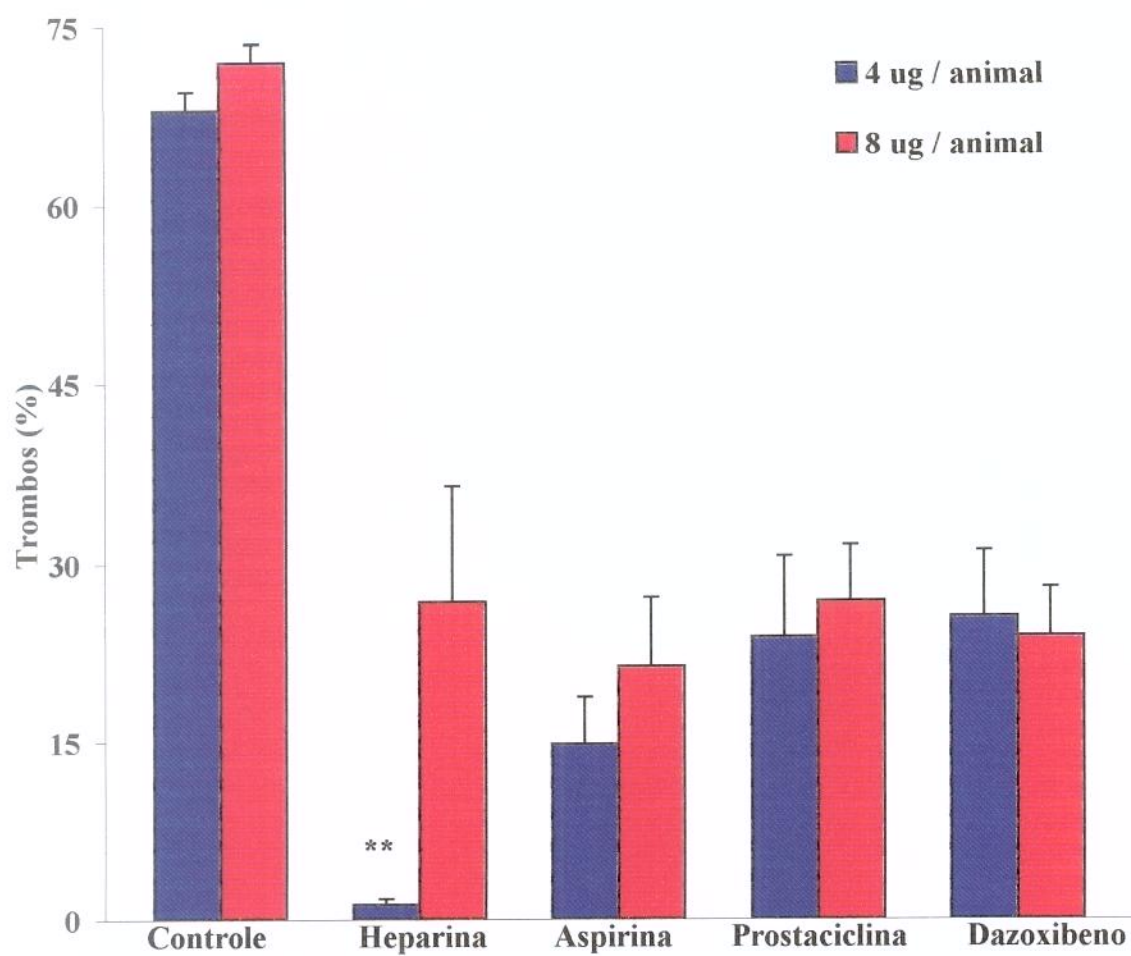
**Figura 11:** Percentagem de trombos induzidos pela convulxina (Cx), observados após diferentes tratamentos. As colunas em azul e vermelho representam os resultados obtidos com Cx nas doses de 4 e 8 µg/animal, respectivamente. A: controle (cx); B: heparina; C: aspirina; D: prostaciclina; E: dazoxiben; F: metronidazol; G: metisergida e H: mepiramina (n = 16 para o controle e n = 8 para os demais tratamentos). Os dados estão apresentados como média ± EPM. \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.



**Figura 12:** Percentagem de trombos induzidos pela convulsina (4 µg/animal), após diferentes tratamentos com associação de drogas (n = 8 para todos os tratamentos). O controle (cx) apresentou 70% de trombos. Os dados estão apresentados como média ± EPM. \* p<0,05 em relação à aspirina; ### p<0,001 em relação à prostaciclina e +++ p<0,001 em relação ao Dazoxiben.

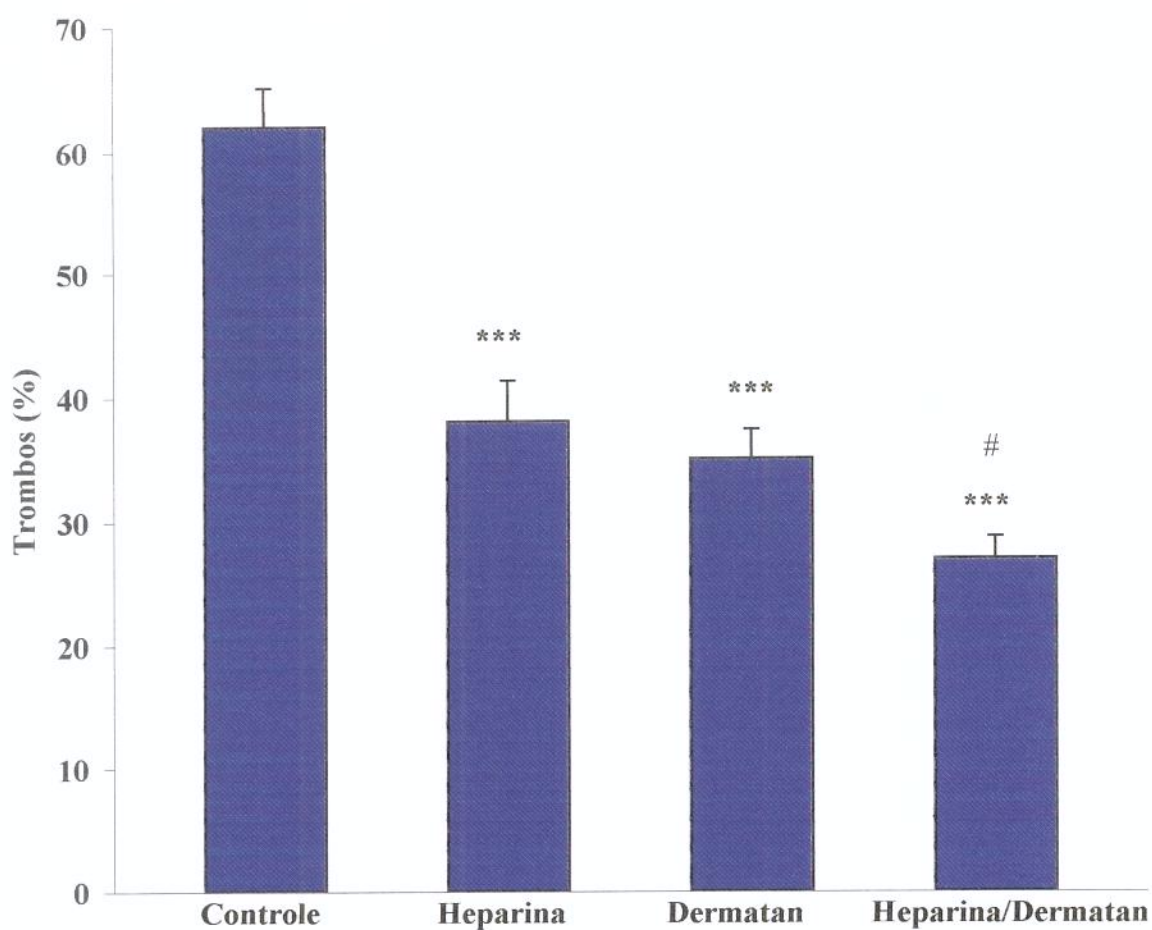


**Figura 13:** Percentagem de trombos induzidos pela convulxina (8µg/animal), após diferentes tratamentos com associação de drogas. (n = 8 para todos os tratamentos). O controle (cx) apresentou 75% de trombos. Os dados estão apresentados como média ± EPM. \*\* p<0,01 em relação à aspirina.



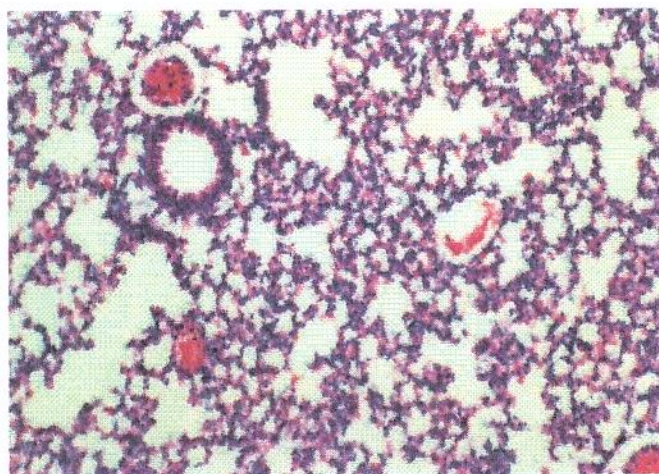
**Figura 14:** Comparação entre as percentagens de trombos induzidos por duas doses de convulxina, observados após diferentes tratamentos ( $n = 16$  para o controle e  $n = 8$  para os demais tratamentos). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,05$  em relação à heparina (8  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ).



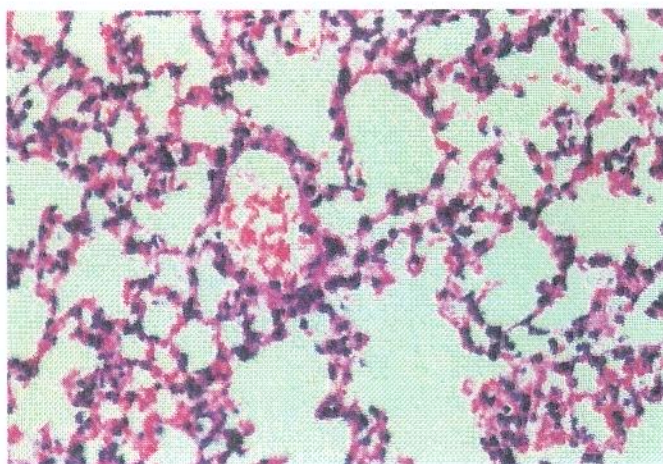


b

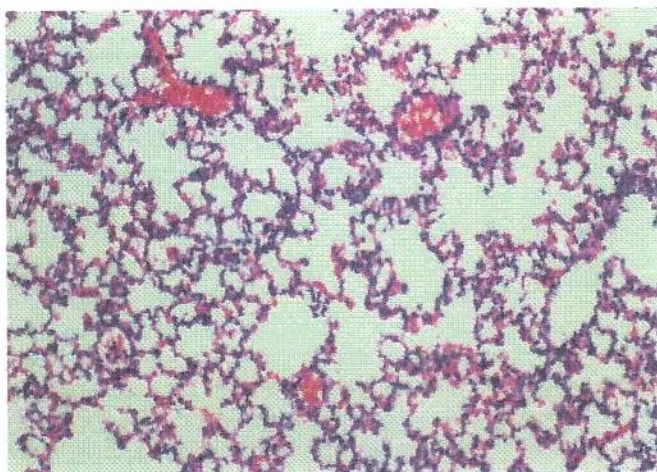
**Figura 15:** Comparação entre as percentagens de trombos induzidos pela convulsina (4µg/animal), observados após tratamento com heparina (100 UI/kg), sulfato de dermatan (1 mg/kg) e a associação de ambos (n = 4 para todos os tratamentos). Os dados estão apresentados como média ± EPM. \*\*\*p<0,001 em relação ao controle; # p<0,05 em relação à heparina .



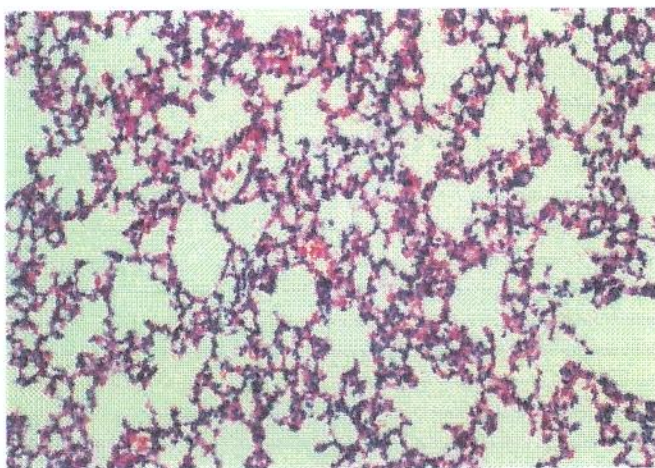
**Figura 16:** Efeito inibidor da heparina (12.500 UI/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina. Vasos pulmonares com hemácias são visualizados (200x, coloração HE).



**Figura 17:** Efeito inibidor da heparina + aspirina (2.500 UI/kg + 20 mg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina. Vasos pulmonares com hemácias são visualizados (400x, coloração HE).

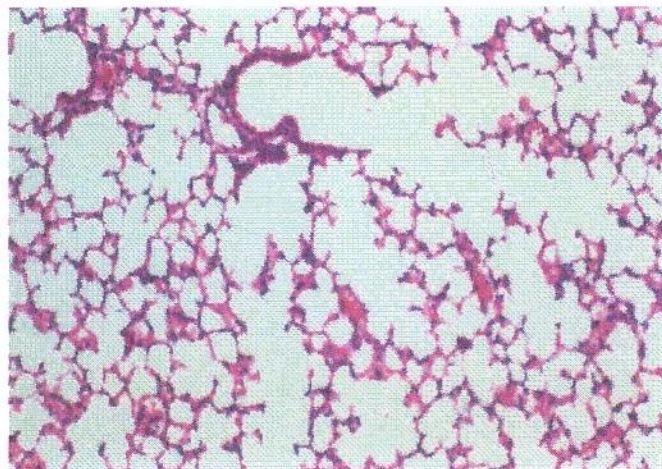


**Figura 18:** Efeito inibidor da heparina + prostaciclina (12.500 UI/kg + 1 µg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulsina. Vasos pulmonares com hemácias são visualizados (200x, coloração HE).



**Figura 19:** Efeito inibidor da heparina (100 UI/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulsina. Vasos pulmonares com hemácias são visualizados (200x, coloração HE).





**Figura 20:** Efeito inibidor da heparina + sulfato de dermatan (100 UI/kg + 1 mg/kg) sobre a trombose pulmonar induzida pela convulxina. Vasos pulmonares com hemácias são visualizados (200x, coloração HE).

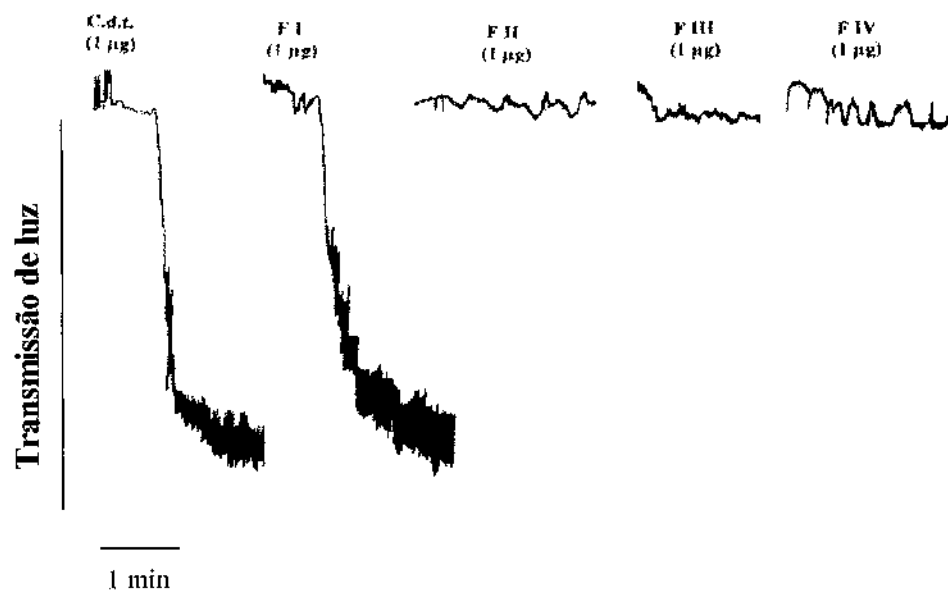
No grupo dos animais, no qual foram retirados o coração, baço, rins, fígado e cérebro, não foi observada nenhuma alteração histológica, em microscopia óptica comum.

### 3.4. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

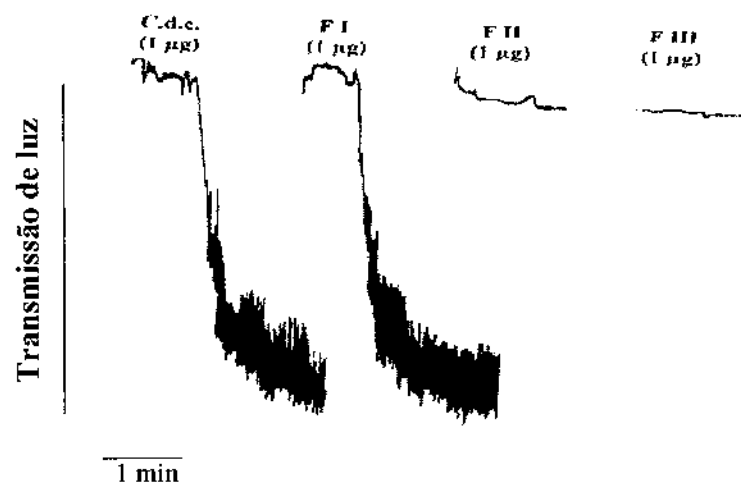
Logo após adicionar o veneno de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* (1 µg/ml) ou convulxina de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* (1 µg/ml) ao PRP, observamos uma queda na transmissão luminosa do agregômetro que corresponde à mudança de forma da plaqueta de discóide para esférica. Esse fenômeno é rapidamente seguido pelo aumento na transmissão luminosa, que corresponde à agregação plaquetária. As demais frações obtidas nos fracionamentos da *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* utilizadas apenas na dose de 1 µg/ml, mostraram-se inefetivas (fig. 21 e 22).

Para a convulxina dos venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* fez-se uma curva dose-dependente, em que o veneno de *C. d. terrificus* agregou até a dose de 8 ng e o veneno de *C. d. cascavella* agregou até a dose de 3 ng (dados não mostrados).

A



B



**Figura 21:** Agregação plaquetária (em PRP) induzida pelo veneno de *C.d.terrificus* e as frações (A) e de *C.d.cascavella* e as frações (B), obtidas através de gel de filtração em Sephadex G-75.

### 3.5. COAGULAÇÃO

A convulxina de ambos os venenos é desprovida de atividade coagulante (TC>30 min), embora os venenos dos quais se origina apresenta tempo de coagulação de 18 a 30 seg., semelhante ao controle positivo de *B. jararaca*, que apresentou um tempo de coagulação de 10 a 15 seg.

## 4. DISCUSSÃO

A idéia que embasou o presente trabalho é a de que a convulsão e / ou apnéia produzidas pela convulxina nativa (ou, em dose equipotente, pela peçonha total) teria origem periférica e estaria relacionada às atividades agregante plaquetária e trombótica da convulxina.

Um fato importante a nosso ver é a identidade existente entre os polipeptídeos (faixas de 12,5 e 13,5 kDa) obtidos neste trabalho, após redução e os descritos por Franceschetti *et al* (1997) e Marlas (1983 a, 1983 b). Como esses autores não descreveram outra atividade biológica além da agregante, torna-se necessário comparar os possíveis efeitos trombóticos do composto de 72 kDa (obtido após tratamento com urea 6N) e a convulxina nativa (PM>116 kDa).

Nossos resultados mostram que tanto a trombose pulmonar, como a agregação plaquetária induzida pelas peçonhas total de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* estão relacionadas com a presença da convulxina em ambas. De fato, os animais injetados com as demais frações ativas (exibindo sua toxicidade usual), não apresentaram trombos em seus pulmões e as frações também não foram capazes de induzir a agregação.

O fato de, histologicamente, só terem sido detectadas alterações pulmonares, pode sugerir ser o pulmão o órgão alvo desta toxina; entretanto, a ausência de alterações visíveis em fígado, rim, baço, cérebro e coração pode estar relacionado à técnica utilizada, pois mediante de observações mais finas, microscopia eletrônica (por exemplo) poderiam ser detectadas mesmo alterações incipientes.

Até o presente momento, entretanto, desconhecemos a *causa mortis* da convulxina. Nossos resultados, em relação ao processo trombótico da convulxina mostram um fenômeno autolimitado, isto é, a formação de trombos pulmonares situa-se dentro de uma faixa estreita, em doses relacionadas à sobrevida dos animais.

Observando-se a evolução histórica dos trabalhos que utilizaram convulxina como 'instrumento de pesquisa' na agregação plaquetária, alguns fatos de relevância incluem a extraordinária potência da convulxina. De fato, a atividade agregante da convulxina é cerca de 150 vezes maior do que o da trombina e 1000 vezes maior do que o colágeno (Brinkhous & Smith, 1988; Smith & Brinkhous, 1991). Quanto ao mecanismo de ação, foi demonstrado inicialmente que convulxina induz a secreção de ADP (Vargaftig *et*



*al*, 1980). Como nem o sistema que remove ADP (CP/CPK), nem a exaustão dos estoques de ADP (pela trombina), previnem a agregação induzida pela convulxina, torna-se clara a necessidade de outra via de atuação. Convulxina promove também a liberação de TXA<sub>2</sub> (Vargaftig *et al*, 1980). Entretanto, a aspirina que inativa a ciclooxigenase ou o dazoxiben que inibe a Tx-sintase, (Iacoviello *et al*, 1994) impedem apenas a agregação induzida por baixas doses de convulxina. Torna-se claro, pois, que outros mecanismos que não dependem da TXA<sub>2</sub> nem do ADP devem estar envolvidos nesta ativação. Assim, a convulxina parece exercer parte de seus efeitos por meio dos receptores do colágeno, mostrando mesmo uma dessensibilização cruzada com o mesmo (Vargaftig *et al*, 1983). A possibilidade de que o receptor GPIB estivesse envolvido (como no caso de outras proteínas de origem animal) foi afastada por Polgár *et al* (1997), ao demonstrar que a ligação se fazia mediante o receptor glicosilado 62-kDa da membrana plaquetária, possivelmente por adesão. Desta forma a convulxina inibiria tanto a agregação como a fosforilação da tirosina evocados pelo colágeno, utilizando esta via comum. Entretanto, há também diferenças entre outras vias usadas pelo colágeno e pela convulxina.

Em outros estudos também recentes (Faili *et al*, 1994) sugeriu-se que a ativação plaquetária induzida pela convulxina envolveria a ativação da fosfolipase C, levando à produção de IP<sub>3</sub> e DAG, segundos mensageiros que aumentam o Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Em resumo, apesar dos 20 anos de estudo e dos numerosos trabalhos realizados, o mecanismo da agregação plaquetária pela convulxina permanece a ser esclarecido.

Nossos resultados estabelecem, sem sombra de dúvida, que a convulxina, dentro das doses indicadas é um modelo extremamente interessante para o estudo da trombose pulmonar. Embora o efeito trombótico ocorra dentro de uma faixa estrita, ele é constante. Considerando-se os grupos controle e aqueles que nos serviram para a determinação da DE<sub>50</sub> ; mais de 50 animais injetados com convulxina mostraram a constância do efeito trombótico.

Conforme seria de se esperar; caso a formação de trombos estivesse ligada apenas ao efeito agregante da convulxina, sua inibição por qualquer um dos agentes conhecidos como antiagregantes, estaria limitado às menores doses de convulxina.

De fato, a comparação observada entre as drogas mais efetivas frente à formação de trombos evocada pelas doses de 4 e 8 µg de convulxina mostra uma tendência de diminuição da proteção, quando se aumenta a dose.

Em relação à heparina, os valores obtidos são significativamente diferentes. De fato, a heparina por si só, além de bastante efetiva mostrou-se capaz de potencializar os efeitos as demais drogas utilizados; a AAS, a PGI<sub>2</sub> e o dazoxiben.

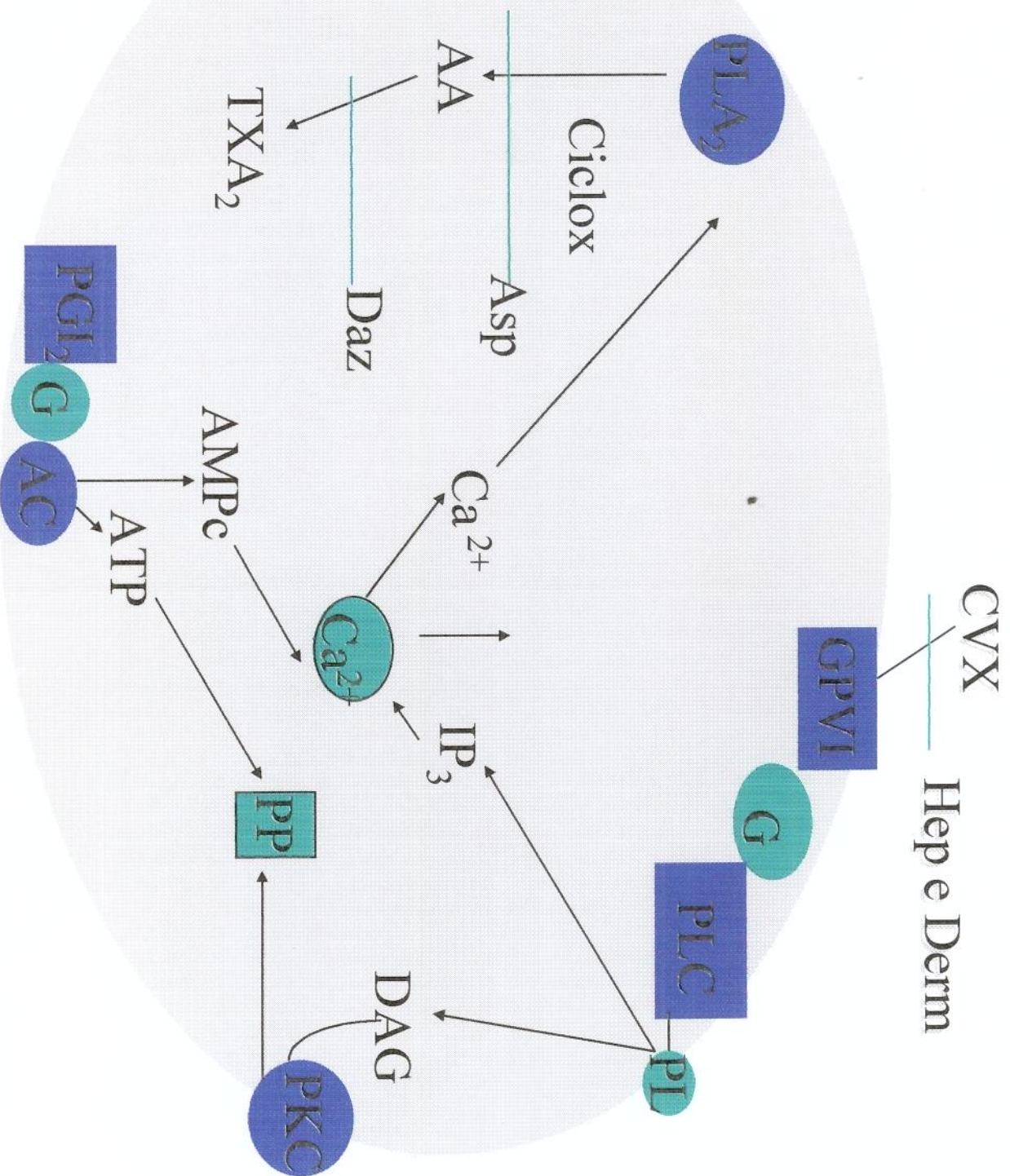
Inicialmente pensamos que a inibição pela heparina estivesse ligado a seu efeito anticoagulante. Neste caso, a convulxina, que é incapaz de promover coagulação, *in vitro*, estaria ativando, via agregação, alguns fatores da cascata da coagulação, *in vivo*. Nossos resultados com o dermatan (totalmente desprovido de atividade anticoagulante) descartam esta hipótese.

No presente estágio, acreditamos que a adesão da convulxina a sítios inespecíficos de reconhecimento na superfície plaquetária (outros, além dos receptores para o colágeno e do WGA) envolva o reconhecimento de cargas presentes em sua molécula. Se a convulxina fosse de natureza básica, sua combinação com as proteínas aniônicas seria mais facilmente explicável. Entretanto, este não é o caso, pois a convulxina é uma proteína levemente ácida de pI 6,0 (Prado-Franceschi, 1970).

Como a heparina, o dermatan é também glicosaminoglicano. Ambos são capazes de exercer um efeito antitrombótico dose-dependente em coelhos (Carrie *et al*, 1992). Ambos foram capazes de inibir de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a formação de trombos pela convulxina e a associação de ambos mostrou-se mais efetiva ( $p < 0,05$ ) do que a utilização da heparina, mas não do dermatan, sugerindo maior atividade do dermatan neste modelo.

A multiplicidade de pontos de ação agregante da convulxina está representada no esquema a seguir. Além das drogas inibidoras cujo o mecanismo é bem conhecido (AAS, dazoxiben, PGI<sub>2</sub>), estão presentes também a heparina e o dermatam com a sugestão de seu ponto de ação em cargas na membrana.

# Agregação induzida pela convulxina



## 5. CONCLUSÕES

a)A convulxina, poderoso agente agregante plaquetário in vitro, induz a formação de trombos no pulmão de camundongos, nas doses de 20 à 1000 $\mu$ g/kg.

b)Tanto a heparina, como a aspirina, a prostaciclina e o dazoxiben são capazes de, isolados ou em associação, inibir o efeito trombótico da convulxina. A heparina foi a mais eficaz.

c)O dermatan potencializou o efeito da heparina, a qual, por sua vez, potencializou os efeitos das demais drogas.

d)A letalidade da convulxina, em doses altas, limita a sua utilidade como ferramenta neste modelo.



Convulxin is a high molecular weight, non-enzymatic, platelet aggregating protein present in the venom of South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. In this work, we investigated the ability of convulxin to cause pulmonary thrombosis in mice after intravenous injection and examined the possible mechanism (s) involved using specific inhibitors. Convulxin was purified from *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus* venom by chromatography on Sephadex G-75 in 0.005 M ammonium formate, pH 3.5. Male Swiss mice were injected i.v. with varying doses of convulxin and then euthanized 30 min. Later after which the lungs were rapidly removed, fixed and processed for histological analysis to determine the frequency of pulmonary thrombosis. Human platelet-rich plasma was prepared by standard differential centrifugation. Convulxin from *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus* venoms aggregated human platelet at concentrations  $\geq 8$  ng/ml and cause pulmonary thrombosis at doses  $\geq 20$   $\mu$ g/kg. The latter was dose-dependent at doses up to 400  $\mu$ g/kg, but decreased at higher dose (up to 1000  $\mu$ g/kg) which produced the convulsions characteristic of this toxin. In no case did the frequency of thrombi (expressed as the percentage of vessels occluded with thrombi) exceed 70%. Histological examination by light microscopy showed that there was no thrombus formation in other organs such as heart, kidney and liver.

Heparin and dermatan (anionic molecules) were partially effective at preventing the thrombotic action of convulxin, particularly at low doses of the latter, perhaps through a direct electrostatic interaction with convulxin. Mepyramine (histamine H<sub>2</sub> receptor antagonist), methysergide (5-HT receptor antagonist) and metronidazole had no effect on the formation of thrombi induced by convulxin. Similarly, prostacyclin, which increases intracellular cAMP levels, dazoxiben, a thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitor, and aspirin, a cyclooxygenase inhibitor, did not inhibit convulxin-induced thrombosis. These results suggest that there is no direct relationship between the platelet aggregation and the convulsions produced by convulxin and that mediators known to affect convulxin-induced aggregation do not affect the thrombotic activity, perhaps because these actions involve different pathways.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



- ADNOT, S.; JOSEPH, D.; VARGAFTIG, B.B. Antagonists of PAF-acether do not suppress thrombin-induced aggregation of ADP-deprived and aspirin-treated human platelets. **Agents Actions** 21:1-2, 1987.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**. 25: 1163-1168, 1987.
- BARRIO, A. Estudio eletroforético del veneno de serpiente de cascabel. **Cienc. Invest.** 10: 368, 1954.
- BIEBER, A.L.; MILLS, J.P.JR.; ZIOLKOWSKI, C.; HARRIS, J. Rattlesnake neurotoxins: biochemical and biological aspects. **J. Toxin. Toxin Rev.** 9: 285-306, 1990.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZ, M.P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin. Half-century of investigations on a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** 39: 439-448, 1989.
- BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**. 194: 927-929, 1962b.
- BORN, G.V.R. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. **J. Physiol.** 162: 67-68, 1962a.
- BRAZIL, O.V. Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan** 33: 981-992, 1966.
- BRAZIL, O.V. & EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Formosan Med. Assoc.** 71: 394, 1972.
- BRAZIL, O.V.; PRADO-FRANCESCHI, J.; WAISBICH, E. Fator neurotóxico na peçonha da *Crotalus durissus terrificus* diferente da crotoxina e da crotamina. **Ciênc. Cult.** 19: 658, 1967.

- BRAZIL, O.V.; PRADO-FRANCESCHI, J.; WAISBICH, E. Pharmacology of crystalline crotoxin I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan** 33: 973-980, 1966.
- BRAZIL, O.V.; FARINA, R.; YOSHIDA, L.; OLIVEIRA, V.A. Pharmacology of crystalline crotoxin III. **Mem. Inst. Butantan** 33: 993-1000, 1966.
- BRINKHOUS, K.M. & SMITH, S.V. Platelet-Aggregation nocoagulant snake venom fractions. **Hemostasis and animal venoms** 7: 363-376, 1985.
- CALMETTE, A. Contribution à étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de envenimation. **Ann Inst. Pasteur** 8: 275-291, 1894.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock Publishing: Ithaca, 1989, pp.180-226.
- CARRIE, D.; CARANOBE, C.; GABAIG, A.M.; LARROCHE, M. ; BONEU, B. Effects of heparin, dermatan sulfate and of their association on the inhibition of venous thrombosis growth in the rabbit. **Thrombosis and Henostasis** 68: 637-641, 1992.
- CHIGNARD, M.; LE COUEDIC, J.P.; TENCE, M.; VARGAFTIG, B.B.; BENVENISTE, J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. **Nature** 279: 799-800, 1979.
- DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry** 43:10363-10370, 1991.
- DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms In: BUCHERL W, BERCKLEY E, DEULOFEU V, eds. **Venomous animals and their venom**. 2 Academia Press: New York, 1968.
- ESMEL, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathways. **Science** 235: 1348-1352, 1987.

- FAILI, A. ; RANDON, J.; FRANCISCETTI, I.M.B.; VARGAFTIG, B.B.; HATMI, M.  
Convulxin-induced platelet aggregation is accompanied by a powerful activation of the phospholipase C pathway. **J. Biochem.** **298**: 87-91, 1994.
- FRANCISCETTI, I.M.B.; BERNARD, S.; LEDUC, M.; CARLINI, C.R.; HATMI, M.; RANDON, J.; FAILI, A.; BON, C. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon** **8**: 1217-1228, 1997.
- FRANCISCETTI, I.M.B.; GHAZALEH, F.A.; REIS, R.A.M.; CARLINI, C.R.; GIMARÃES, J.A. Convulxin induces platelet activation by a tyrosine-kinase-dependent pathway and stimulates tyrosine phosphorylation of platelet proteins, including PLC $\gamma$ 2, independently of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . **Arch. Biochem. and Biophys.** **2**: 239-250, 1998.
- GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Ciên.** **22**: 141-150, 1950.
- HAMES, B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. eds. **Gel-Electrophoresis of Proteins - a Practical Approach.** IRL Press Oxford, 1990, pp 1-147.
- HOURANI, S. M. O. & CUSACK, N. J. Actions and structure-activity relationships of purines on platelets. In Purines: Pharmacology and Physiological Roles, eds. By T. W. Stone, Macmillan, London, 1991, pp 163-173.
- HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **68**: 1560-1563, 1971.
- HOLMSEN, H. & WEISS, H.J. Secretable pools in platelets. **Annu. Rev. Med.** **30**: 119-130, 1979.
- HOMMA, M. & TU, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br. J. Exp. Path.** **52**: 538-542, 1971.

- IACOVIELLO, L.; CURTIS, A.; D'ADAMO, M.C.; AMORE, C; BUCZKO, W.; GAETANO, G.; DONATI, B. Prostacyclin is required for t-PA release after venous occlusion. **Am. Physiol Society**. 11: 429-434, 1994.
- JUANG, R.H.; CHANG, Y.D.; SUNG, J.C. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in a cellophane sandwich. **Anal.-Biochem**. 141: 348-350, 1984.
- KINLOUGH-RATHBONE, R.L.; PACKHAM, M.A.; REIMERS, H.J.; CAZENAVE, J.P.; MUSTARD, J.F. **Lab. Clin. Med**. 90: 707-719, 1977.
- LONGENECKER, G.L. **The platelets. Physiology and Pharmacology**. Academic Press: Orlando, 1985a.
- LONGENECKER, G.L. Platelet arachidonic acid metabolism. **In: The Platelets: Physiology and Pharmacology**. (Longenecker, G.L., ed.). Academic Press: Orlando, 1985b, pp.159-185.
- MACEVER, R.P. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am**. 4: 87-105, 1990.
- MACFARLANE, E.D. & MILLS, D.C.B. The effects of ATP on platelets: evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. **Blood**. 46: 309-320, 1975.
- MAGALHÃES, R.A; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 28: 228-233, 1986.
- MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA **Acidentes por Animais Peçonhentos. Identificação, Diagnóstico e Tratamento**. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 1993.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** 36: 1749-1800, 1998.

- MARKWARDT, F. The release of biogenic amines from blood platelets under the influence of *Crotalus d. terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan** **33**: 851-854, 1966.
- MARLAS, G.; JOSEPH, D.; HUET, C. Isolation and electron microscope studies of a potent platelet-aggregating glycoprotein from the venom of *Crotallus durissus cascavella*. **Biochimie** **65**: 405-416, 1983a.
- MARLAS, G.; JOSEPH, D.; HUET, C. Subunit structure of a potent platelet- aggregating glycoprotein isolated from the venom of *Crotallus durissus cascavella*. **Biochimie** **65**: 619-628, 1983b.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon** **21**: 393-404, 1983.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. Mytoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.** **48**: 223-236, 1990.
- MELLO, L.E.A.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J.R.; CAVALHEIRO, E.A. Convulxin does not induce convulsions when injected into the rat dorsal hippocampus. **Acta Physiol. Pharmacol. Lationoam.** **39**: 353-358, 1989.
- MÉNEZ, A. Molecular immunology of snake toxins. **Pharmac. Ther.** **30**: 91-113, 1985.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de Diagnósticos e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Fundação Nacional da Saúde. Brasília, D.F., 1998.
- MICHELL, R. H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. **Biochim. Biophys. Acta.** **415**: 851-857, 1975.
- MUSTARD, J.F. & PACKHAM, M.A. Factors influencing platelet function, adhesion, release and aggregation. **Pharmacol. Rev.** **22**: 97-187, 1970.

- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.** 41: 314-328, 1979.
- OWNBY, C.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; COLBERG, T.R.; ODELL, G.V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon** 20: 877-885, 1982.
- PACKHAM, M.A.; GUCCIONE, M.A.; GREENBERG, J.P.; KINLOUGH-RATHBONE, R.L.; MUSTARD, J.F. **Blood** 50: 915-926, 1977.
- POLGÁR, J.; CLEMETSON, J.M.; KEHREL, B.E.; WIEDEMANN, M.; MAGNENAT, E.M.; WELLS, T.N.C.; CLEMETSON, K.J. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **The J. of Biol. Chem.** 271: 13576-13583, 1997.
- PRADO-FRANCESCHI, J. **Estudo sobre convulxina**. Tese de doutorado, Universidade de Campinas, 1970.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & ANTUNES, E. Effect of metronidazole on platelet aggregation. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 22: 1497-1500, 1989.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; LOPES DE FARIA, J.; LOBO DE ARAUJO, A. **Convulxina e trombose pulmonar difusa**. 1º Congresso Bras. de Farm. e Terapêutica Exp. Pirassununga, SP. 1982.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; TAVARES, D.Q.; HERTEL, R.; LOBO DE ARAUJO, A. Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom on platelets and leukocytes in anesthetized rabbits. **Toxicon** 19: 661, 1981.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon** 19: 875, 1981.

- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional. Distúrbios Hemodinâmicos e dos Líquidos**. 7ª.ed.Rio de Janeiro. 1993, 83-113.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E. AND DEULOFEU, V. eds., **Venomous Animals and their Venoms**. Vol 2. Academia Press: New York, 1971, pp. 345-384.
- RUSSEL, F.E. Snake venom immunology: historical and practical considerations. **J. Toxicol. Toxin. Rev.** 7: 1-82, 1988.
- SANO-MARTINS, I. & DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon** 30:141-150, 1992.
- SJOSTROM, L.; AL-ABDULLA, I.H.; RAWAT, S.; SMITH, D.C.; LANDON, J. A comparison of ovine and equine antivenoms. **Toxicon** 32: 427-433, 1994.
- SKAER, R.J.; PETERS, P.D.; EMMINES, J.P. The localization of calcium and phosphorus in human platelets. **J. Cell Sci.** 15: 679-692, 1974.
- SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Purificação e cristalização do veneno de cascavel. **Mem. Inst. Butantan** 12: 505-508, 1938.
- SMITH, S. V. & BRINKHOUS, K. M. Inventory of exogenous platelets-aggregating agents derived from venoms. **Thromb. Haemostas** 66: 259, 1991.
- SVASTI, J. & PANIJAN, B. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: a simple explanation of why it works. **J. Chem. Educ.** 54: 560-562, 1977.
- VARGAFTIG, B.B.; CHIGNARD, M.; BENVENISTE, J. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. **Biochim. Pharmacol.** 30:263-271, 1981.

- VARGAFTIG, B.B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHIGNARD, M.; CHEVANCE, G.L. Convulxin-induced activation of intact and of thrombin-degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitisation with collagen. **Eur. J. Pharmacol.** **92**: 57-68, 1983.
- VARGAFTIG, B.B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CHIGNARD, M.; LEFORT, J.; MARLAS, G. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Eur. J. Pharmacol.** **68**: 451-464, 1980.
- VARGAFTIG, B.B. & ZIRINIS, P. Platelet aggregation induced by arachidonic acid is accompanied by release of potencial inflammatory mediators distinct from PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>. **Nature** **244**: 114, 1973.
- WAL, F.; JOSEPH, D.; TOUQUI, L.; VARGAFTIG, B.B. PAF-acether may not mediate the third pathway of platelet aggregation since self-desensitization reduces the effects of low thrombin but enhances those of convulxin. **Thromb. Haemost.** **30**: 99-104, 1985.
- WHITE, J.G. Interaction of membrane systems in blood platelets. **Am. J. Pathol.** **66**: 295-312, 1972.