

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS - ZOOLOGIA

Ação da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: Viperidae) sobre a agregação plaquetária, parâmetros inflamatórios e proliferação celular.

Carolina Maria Alves Bastos
Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2007

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
APRESENTAÇÃO	VIII
ARTIGO 1	1
“Determinação das alterações causadas pelo veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre a atividade das E-NTPDases na capacidade de agregação de plaquetas humanas”.....	1
RESUMO.....	2
INTRODUÇÃO.....	4
MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSSÃO.....	12
REFERÊNCIAS.....	15
FIGURAS.....	18
ARTIGO 2	27
“Avaliação da capacidade imunomoduladora e inflamatória das frações PLA ₂ e Crotapotina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre células mononucleares de sangue periférico humano”.....	27
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	39
FIGURAS.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
ANEXO 1	49
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	50
ANEXO 2	52
NORMAS DO PERIÓDICO.....	53

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o fruto do empenho de muitas pessoas, a maioria não trabalhou diretamente, mas em algum ponto da minha trajetória foram muito especiais. É para elas que vai meu agradecimento.

Em primeiro lugar, a minha mãe. Lucy e minha irmã Clarisse, que me apoiaram e me apóiam incondicionalmente, que compreenderam minhas ausências e ouviram pacientemente meus relatos sobre o trabalho e tudo que se passou durante os últimos 2 anos. Por sempre terem acreditado em mim e no meu trabalho acreditava e pelo exemplo maravilho de pessoas humanas, éticas e capazes.

Ao meu namorado querido, Elton, pelas conversas intermináveis a cerca das técnicas, dos problemas que aconteceram e que pacientemente ouviu minhas angústias, secou minhas lágrimas, me incentivou ao próximo passo até a conclusão da última linha deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pela paciência, compreensão e discussões ao longo deste projeto.

Às professoras, amigas e companheiras de muitos momentos bons e ruins, Fernanda e Melissa, sem vocês não sei se hoje poderia estar aqui, tentando ser um pouco melhor como bióloga e me aperfeiçoando como pessoa. Vocês são muito especiais! Muito obrigada por tudo!

Aos biólogos Eduardo Caberlon (Alemão), Moema Leitão de Araújo e Maria Lúcia Machado Alves, por terem acreditado no potencial desta dissertação, cedência e extração da peçonha das serpentes mantidas no Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre.

Ao prof. Dr. Patrick J. Spencer, do Laboratório de Biologia Molecular do IPEN em São Paulo, pela acolhida, auxílio na execução do fracionamento, compreensão com meu pouco conhecimento na purificação de proteínas, paciência em explicar e demonstrar como deveriam ser feitos os procedimentos. Além disso, por ter me incorporado, apesar das poucas semanas, ao seu grupo de laboratório e ter feito eu me sentir em casa, mesmo tão longe da minha.

À Fernanda Calvo, pelo carinho e longas conversas durante os fracionamentos.

A toda a equipe do IPEM com as qual tive o prazer de conviver, em especial ao Murilo, Jana, Lucélia, Alberto, Natália, Edu (técnico), Claudinha, Profa. Nanci, e demais colegas.

À Célia, pelo apoio enquanto eu estava longe de casa.

Às prof^{as}. Líamara Andrade e Terezinha Munhoz pela cedência de equipamentos de seus laboratórios e aos técnicos da Faculdade de Farmácia, Ícaro Vieira Mühlen, Marcos Aurélio Almeida Pereira, Viviane Dias de Azevedo e Vanessa Silva Silveira pelo auxílio e utilização dos equipamentos, paciência e instruções.

Às secretárias da Faculdade de Biociências, em especial, Josi, Lu, Rô, Ema e Mauro que tantas vezes me auxiliaram prestando informações, e possibilitaram que os “trâmites” burocráticos do mestrado fossem sempre os mais tranquilos.

À secretária da Faculdade de Química, Nilza e à técnica Tati, que se deixaram vampirizar por mim quando ninguém mais estava disponível.

Às meninas da limpeza do laboratório que, quase imperceptivelmente, criavam diariamente condições para que eu pudesse executar este trabalho.

Aos voluntários que me auxiliaram com a doação de amostras de sangue; sem vocês este trabalho não teria sido realizado.

À minha amiga do peito, Fernandinha, minha eterna “Lorinha”, por tantos anos de convivência, lágrimas e gargalhadas divididas, por me incentivar sempre e pelo auxílio inestimável na minha introdução ao universo da bioquímica. É bom saber que Deus coloca pessoas com o teu coração no mundo, e principalmente, no meu caminho.

À prof.^a Carla Bonan, por ter me acolhido em seu laboratório, com palavras inestimáveis de incentivo e auxílio em todos os momentos.

Ao querido prof. Renato por tantas conversas a cerca das relações humanas e o incentivo e preocupação com a execução deste trabalho.

A todo pessoal do laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, em especial ao Edu Rico, Léo, Denis, Stefânia, Fernanda (crespa) e Giana, Marcelo e Mário, pela paciência em dividir a bancada, pela disposição em tirar minhas dúvidas, por vezes banais, pelo carinho, incentivo e atenção. Muito obrigada.

A todo o pessoal do laboratório de Biofísica Celular e Inflamação que acompanhou meu trabalho desde o período de iniciação científica e tantos outros que se juntaram à

minha caminhada. Meu muito obrigado. Em especial à amiga Aline, Luciana, Márcia, e Shanna, amigas “superpoderosas”!

Aos estagiários da nova geração - Biro, Robson e Gui (pelos intermináveis envios de bibliografias) e Ale (por ter feito a diferença na execução final deste trabalho) e da velha geração, Carlos e Marquinhos, obrigada pelo auxílio!

À Karlinha que, apesar de não termos o convívio diário no laboratório, sempre compartilhou comigo alegrias e angústias da vida acadêmica.

À farmacêutica bioquímica Rosélia Mengue Dimer Rubin, pelas dosagens em seu laboratório e horas de sono perdidas.

Aos meus amigos de tantos anos, Edu (Guma), Carol, tia Beth e tio Paulo, que há tanto tempo acompanham minha caminhada e, entre uma notícia e outra, dividem comigo alegrias e preocupações!

Ao tio Milton e tia Ivanir, por tantas idas e vindas à PUC e telefonemas antes das 7h da manhã!!! Não sei se terei a paciência de vocês algum dia! Muuuuuuuuuuito obrigada!!!

A todos os colegas da minha turma de mestrado (2005/I) com quem dividi sorrisos e trabalho. Com os quais fiz “terapia de grupo” dividindo preocupações, angústias, alegrias e expectativas. Pessoal, acabou!!!

Ao CNPq, do qual fui bolsista, pelo incentivo à pesquisa.

RESUMO

As peçonhas de origem animal são misturas complexas ricas em toxinas e enzimas que podem apresentar um número variado de efeitos sobre os mecanismos homeostáticos como, por exemplo, na função plaquetária, além de induzir alterações hematológicas, imunológicas e ativar a liberação de citocinas pró-inflamatórias. No estado do Rio Grande do Sul (RS) há apenas a ocorrência da subespécie *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*), cuja peçonha ainda não possui suas propriedades estudadas. A crotoxina é uma fração que tem como efeito principal atividade neurotóxica pré-sináptica. Esta toxina é composta por duas subunidades denominadas: subunidade básica, que possui atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) e a subunidade ácida, a crotapotina. A PLA₂ atua como estimulador de processos inflamatórios e altera a capacidade agregante plaquetária. Já a crotapotina - uma proteína que em diversos estudos demonstrou potencializar as ações da PLA₂ - possui atividade antiinflamatória *in vivo*, apresentando inibição do edema de pata induzido por carragenina. A avaliação de diferentes parâmetros relacionados a toxicidade e efeitos sobre o sistema homeostático são importantes para a terminação da toxicidade dos venenos de serpentes. Cabe salientar a importância de investigar venenos de espécies que possuem efeitos já descritos para algumas regiões do país, pois são descritas alterações nas peçonhas e em seus efeitos conforme a localidade que ocorrem. Diversos parâmetros podem ser utilizados, como testes que descrevam a presença das toxinas (como a purificação feita por FPLC) e testes que avaliem seus efeitos (como testes de liberação de citocinas, avaliação sobre a alteração de atividade de enzimas de membranas celulares, entre outros). Nossos estudos buscaram avaliar as características do veneno sobre a agregação plaquetária e os possíveis mecanismos envolvidos neste processo, bem como avaliar a ação inflamatória/antiinflamatória de alguns componentes da peçonha de *Cdt*. Para cumprir estes objetivos foram desenvolvidos dois artigos: O primeiro artigo foi desenvolvido em função das alterações que a peçonha de *Cdt* pode causar no processo de agregação plaquetária, buscando-se identificar os possíveis mecanismos de ação que levam a estas alterações. Verificou-se que a peçonha da *Cdt* do Rio Grande do Sul possui a capacidade agregante plaquetária já descrita para a subespécie e seu mecanismo de ação não parece ser via NO nem alterações da atividade das E-NTPDases. O segundo artigo buscou entender como duas subunidades formadoras da crotoxina, a crotapotina e a PLA₂, podem apresentar efeitos antiinflamatórios e inflamatórios, respectivamente em culturas de células. Para avaliar as ações das subfrações foi quantificada a liberação de TNF- α . As células mononucleares de sangue periférico humano, estimuladas com fitohemaglutinina, foram incubadas com diferentes concentrações de crotapotina e PLA₂, verificando-se a capacidade proliferativa, imunomoduladora, as respectivas citotoxicidades e expressão da citocina inflamatória, TNF- α .

ABSTRACT

ACTION OF THE *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: Viperidae) ON THE PLATELETS AGGREGATION AND CELLULAR PROLIFERATION

The poisons found in animals are complex mixtures rich in toxins and enzymes that can present a large number of effects over the haemostatic mechanisms, as an example, at the platelets functions; they also induct hematological and immunological alterations and activate the liberation of pro-inflammatory cytokines. Between the Brazilian rattlesnakes species it is distinguished the *Crotalus* genera. At the Rio Grande do Sul state (RS) only the subspecies *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) occurs, which poison's proprieties has yet no studies. The crotoxin molecule is composed by two subunits named: basic, that has a phospholipase A₂ enzyme (PLA₂) activity, and the acidic, called crotapotin. PLA₂ has an inflammatory activity and changes the platelets aggregation. Crotapotin - a protein that has shown in several studies that increases the PLA₂ action - modulates the inflammatory response *in vivo*, decreasing carrageenin-induced rat paw oedema. The evaluation of different parameters related to the toxicity and haemostatic system effects is important to determine the toxicity of rattlesnake's venoms. It is important to investigate the venoms from species that has already been described for some states of the country; therefore alterations in the poison and in its effects are known to happen at different locations. Several parameters can be utilized, like tests that describe the presence of the toxins (as the FPLC purification) and tests that evaluate its effects (as cytokines liberation tests, evaluation of alteration on cellular membrane enzymatic activity, and others). This study aimed to evaluate the poison characteristics on platelets aggregation and the possible involved mechanisms, as well to evaluate the inflammatory/anti-inflammatory action of some *Cdt* poison components. To go trough this objectives, two articles has been written: The first was developed in function of the alterations that can be caused by the *Cdt* venom over the haemostasis and platelet aggregation system, trying to identify possible action mechanisms that leads to these alterations. It was found that RS *Cdt* venom has the platelet aggregating capacity already described for the subspecies. In the second one we tried to understand how two crotoxin formative subunits, crotapotin and PLA₂, could present anti-inflammatory and inflammatory effects respectively. To evaluate the subunits actions, it was quantified the TNF- α production. The peripherical blood mononuclear cells, stimulated by phytohemagglutinin, were incubated at different crotapotin and PLA₂ concentrations to verify the proliferative and immunomodulatory capacity and the respective cytotoxicity.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é constituído de dois artigos, redigidos em português, que após as sugestões e contribuições da banca serão traduzidos e submetidos à revista *Toxicon*. A redação dos artigos foi formatada às normas de submissão da revista.

Sabendo-se que não existem estudos descrevendo a presença das frações para a subespécie *Crotalus durissus terrificus* do Rio Grande do Sul e que vários estudos têm demonstrado variações na atividade e na ação das peçonhas de animais que habitam diferentes localidades, este trabalho buscou analisar a ocorrência das ações descritas para a subespécie utilizando um pool de veneno do Rio Grande do Sul, na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos de ação da peçonha, em especial, sobre células e plaquetas de sangue periférico humano *in vitro*.

Cabe salientar ainda, a relevância deste trabalho em função da ausência de estudos do veneno desta subespécie que habita o estado do Rio Grande do Sul.

O primeiro artigo, intitulado “Determinação das alterações causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a atividade das E-NTPDases na capacidade de agregação de plaquetas humanas”, em função de todas as alterações que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* pode causar na homeostasia e no processo de agregação plaquetária, procurou verificar se a peçonha da *Crotalus durissus terrificus* do Rio Grande do Sul possui capacidade agregante plaquetária já descrita para a espécie e tentou identificar os possíveis mecanismos de ação que levam a estas alterações.

O segundo artigo, intitulado “Avaliação da capacidade imunomoduladora e inflamatória das frações PLA₂ e Crotapotina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre células mononucleares de sangue periférico humano” buscou entender como duas subunidades formadoras da crototoxina, a crotapotina e a PLA₂ podem apresentar efeitos antagônicos. Para avaliar a ação inflamatória ou antiinflamatória destas duas subfrações quantificamos a liberação de TNF- α pelas células mononucleares de sangue periférico humano quando na presença do mitógeno fitohemaglutinina.

ARTIGO 1

“Determinação das alterações causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a atividade das E-NTPDases na capacidade de agregação de plaquetas humanas”

Carolina Maria Alves Bastos¹. Fernanda Cenci Vuaden². Carla Denise Bonan². Patrick Jack Spencer³. Murilo Casare³. Alessandra Magrisso¹. Eduardo Caberlon¹. Maria Lúcia Machado Alves⁴. Moema Leitão de Araujo⁴. Terezinha Munhoz⁵.

Jarbas Rodrigues de Oliveira¹

¹ Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS, Brasil.

² Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS, Brasil.

³ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo - SP, Brasil

⁴ Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil

⁵ Laboratório de Hematologia. Faculdade de Farmácia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil.

“Determinação das alterações causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a atividade das E-NTPDases na capacidade de agregação de plaquetas humanas”

RESUMO

As peçonhas de origem animal são misturas complexas ricas em toxinas e enzimas que podem apresentar um número variado de efeitos sobre os mecanismos homeostáticos como, por exemplo, na função plaquetária. Em alguns casos pode levar a um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e falência de múltiplos órgãos. Dentre as espécies de serpentes existentes no Brasil, destaca-se o gênero *Crotalus*. No estado do Rio Grande do Sul (RS) há apenas a ocorrência da subespécie *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) deste gênero, cuja peçonha ainda não possui suas propriedades estudadas. A fosfolipase A₂ (PLA₂) é uma enzima lipolítica, formadora da crotoxina do veneno de *Cdt* atuando como estimulador de processos inflamatórios e também sobre a capacidade agregante de plaquetas. O óxido nítrico (NO) é considerado um bom parâmetro para a visualização da atividade agregante/antiagregante plaquetária, pois esta espécie reativa de nitrogênio altera a modulação e degranulação das plaquetas submetidas a um estímulo agregante. Existem também algumas enzimas nas membranas plasmáticas celulares, e entre as diversas famílias existentes podemos destacar as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados até os seus respectivos nucleotídeos monofosfatados. Nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina apresentam um importante papel na agregação plaquetária, sendo que o ATP e o ADP estão diretamente envolvidos. Tendo em vista o envolvimento que a peçonha de *Cdt* e a sua subfração PLA₂ tem nos processos de homeostasia e agregação plaquetária, este estudo tem por objetivo verificar se a peçonha de *Cdt* do Rio Grande do Sul possui atividade prótrombótica e se esta atividade estaria relacionada às E-NTPDases ou ao óxido nítrico. Foram executados neste estudo cromatografias por FPLC do veneno de *Cdt* do RS e do estado de São Paulo para fins comparativos, teste de agregação plaquetária com plasma rico em plaquetas com diferentes doses de veneno de *Cdt* e de PLA₂ com a utilização de ADP como controle de agregação. Também foram medidos os níveis de NO no sobrenadante do PRP tratados com o veneno de *Cdt*. A avaliação da atividade específica das E-NTPDases foi avaliada na presença do veneno de *Cdt* e de PLA₂ em diferentes concentrações. Todos os valores medidos neste trabalho foram expressos em média \pm erro padrão. Foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Em conclusão, observou-se que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* do estado do Rio Grande do Sul, apesar de ter diferido do perfil cromatográfico do pool de veneno de São Paulo, foi capaz de induzir a agregação plaquetária como já descrito para esta espécie, evidenciando que os picos que diferenciaram o cromatograma do Rio Grande do Sul do cromatograma de São Paulo, possivelmente não interferem na ação do veneno sobre a agregação plaquetária. Também é importante salientar que a capacidade de agregar plaquetas não se deve aos mecanismos que envolvem inibição de NO ou das E-NTPDases. Sugere-se que a PLA₂, subunidade protéica da crotoxina tenha sido a responsável por causar aumento na atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP do veneno demonstrando que este pode ser o mecanismo da ação antiagregante plaquetário desta subfração.

Palavras chaves: veneno *Crotalus durissus terrificus*, agregação plaquetária, E-NTPDases, PLA₂

INTRODUÇÃO

As peçonhas de origem animal são misturas complexas ricas em toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos que podem apresentar um número variado de efeitos sobre os mecanismos homeostáticos, incluindo coagulação, fibrinólise e alteração na função plaquetária. Em alguns casos pode levar a um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e falência de múltiplos órgãos (Hutton & Warrel, 1993; Francischetti et al., 2000; Sampaio et al., 2005).

Dentre as espécies consideradas peçonhentas, destaca-se o gênero *Crotalus* (Linnaeus, 1758), (SERPENTES: Viperidae) com ampla distribuição no território brasileiro, exceto Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e regiões litorâneas (Filho et al., 2001). Este gênero é representado por uma espécie no país, *Crotalus durissus*, sendo que, no estado do Rio Grande do Sul, há a ocorrência apenas da subespécie *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) (Jorge & Ribeiro, 1990).

As principais toxinas formadoras do veneno de *C. durissus terrificus* são a crotoxina, crotamina, convulsiva e girotoxina (Alexander et al., 1988).

A crotoxina é uma fração que tem como efeito principal atividade neurotóxica pré-sináptica. Esta toxina é composta por duas subunidades denominadas: subunidade básica, que possui atividade fosfolipásica A2 (PLA₂), e intensa toxicidade, e a subunidade ácida - crotapotina - uma proteína que em diversos estudos demonstrou potencializar as ações da PLA₂ (Aguiar, 1997).

A PLA₂ é uma enzima lipolítica, atuando como estimulador de processos inflamatórios através do aumento de ácido aracônico (AA), prostaglandinas, leucotrienos, ciclooxigenase (COX) do tipo 1 e 2, e eicosanóides que estão envolvidos na resposta inflamatória (Garcia et al., 2003). A estimulação de COX 1 está diretamente envolvida nos processos de agregação plaquetária através do influxo de cálcio para as plaquetas quando submetidas a um estímulo agregante. Além disso, a PLA₂, também é naturalmente sintetizada no organismo participando ativamente no estímulo celular de lesão e agravamento de patologias. Além da atividade inflamatória, a PLA₂ apresenta uma grande variedade de funções, como atividade anticoagulante e ativador/inibidor a agregação plaquetária (Loscalzo, 2001).

Existem diversos mecanismos que interferem na capacidade agregante de plaquetas, sejam eles causados por patologias, medicamentos, toxinas animais - como os venenos - entre outros fatores (Zanzieguer, 2002).

Entre os fatores que atuam na agregação/antiagregação, o óxido nítrico (NO), tem sua síntese regulada pelo próprio metabolismo plaquetário ou por fatores externos a plaqueta. O NO é considerado um bom parâmetro para a visualização da atividade agregante/antiagregante plaquetária, pois esta espécie reativa de nitrogênio altera a modulação e degranulação das plaquetas submetidas a um estímulo agregante. Originalmente, o NO foi descoberto como um vasodilatador derivado do endotélio e, também, como um mediador vascular que atua sobre a atividade antiagregante plaquetária pela ativação da guanilil-ciclase, inibindo a fosfoinositol 3-quinase, impossibilitando o influxo de cálcio para a plaqueta, inibindo a COX1, e com isso, inibindo a adesão e agregação plaquetária (Loscalzo, 2001; Mayabara et al., 2004).

Na membrana plasmática das plaquetas existem algumas enzimas que possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Entre elas, podemos destacar a família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados até os seus respectivos nucleotídeos monofosfatados (Zimmermann, 1999). Os nucleotídeos e os nucleosídeos da adenina apresentam um importante papel na regulação do tônus vascular e na agregação plaquetária, sendo que o ATP e o ADP estão envolvidos nas respostas vasoativas e na agregação plaquetária (Burnstock, 1990; Colman, 1990).

ADP é um nucleotídeo que induz mudanças conformacionais nas plaquetas e atua diretamente no processo de agregação. Ele expõe sítios de ligação do fibrinogênio (Colman, 1990), enquanto que o ATP competitivamente inibe a agregação plaquetária ADP-induzida (Coade & Pearson, 1989). A adenosina é um produto final da hidrólise dos nucleotídeos e atua como vasodilatador (Engler, 1991) e inibidor da agregação plaquetária (Kitakase et al., 1991).

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas localizadas nas membranas celulares ou presentes na forma solúvel no meio intracelular e/ou extracelular (Zimmermann, 2001). Assim, as E-NTPDases desempenham um importante papel no controle da homeostasia dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Uma outra família de enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos

extracelulares é a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), capaz de hidrolisar 3',5'-cAMP, ATP, ADP, NAD⁺, Ap_nA (Zimmermann, 2001).

Com relação à hidrólise de nucleotídeos, a NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP igualmente, sendo a proporção da hidrólise destes substratos de 1:1 (Zimmermann, 2001). A NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) hidrolisa o ATP 30 vezes mais que o ADP (Kirley, 1997; Zimmermann, 2001). A NTPDase3 (CD39L3, HB6) e a NTPDase8 preferem o ATP em relação ao ADP numa razão de hidrólise de aproximadamente 3:1 e 2:1, respectivamente. Embora existam tais diferenças na especificidade pelos substratos, todos esses membros da família estão firmemente ligados à membrana plasmática (Zimmermann, 2001; Lavoie et al., 2004; Bigonnesse et al., 2004). As NTPDases4 – 7 estão localizadas em organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2001).

Tendo em vista o envolvimento que a peçonha de *Cdt* e a sua subfração PLA₂ tem nos processos de homeostasia e agregação plaquetária, este estudo tem por objetivo verificar se a peçonha de *Cdt* do Rio Grande do Sul possui atividade agregante plaquetária e se esta atividade estaria relacionada às E-NTPDases ou ao óxido nítrico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Veneno:

Veneno seco de *Crotalus durissus terrificus* do estado do Rio Grande do Sul/ Brasil foi obtido no Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre (NOPA) (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Brasil), e imediatamente conservado a -20°C.

Fosfolipase A₂ (PLA₂) purificada e o veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN).

Todas as amostras foram dissolvidas em solução fisiológica, NaCl 0,9%, no momento do uso, exceto as amostras utilizadas para a cromatografia.

Cromatografia pelo sistema *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC):

Os venenos de *Crotalus durissus terrificus* foram dissolvidos em 1,3 mL de tampão formiato de Amônio 100mM (0,1M), pH 3,0 (ajustado com hidróxido de Amônio). A solução foi homogenizada em aparelho de vortex e centrifugada por 5 minutos a 200g, o sobrenadante foi aplicado à uma coluna de gel de filtração Superdex 75 XK-16 (Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão formiato de amônio 100mM pH 3. As frações foram coletadas em coletor automático do sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) com unidade de leitura óptica para luz UV com determinação contínua de absorbância em comprimento de onda de 280nm, duas bombas P50, programador GP-250 *plus* (Pharmacia Biotech), registrador de cromatograma acoplado ao FPLC, REC 102 (Pharmacia Biotech) e coletador de frações FRAC - 200 (Pharmacia Biotech).

Amostras de sangue periférico humano:

Este estudo foi desenvolvido com o consentimento do Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Todos os voluntários incluídos no estudo receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tiveram 20mL de sangue periférico coletado por punção venosa. Este trabalho está autorizado sobre o registrado número: 0018/05 do Comitê de Ética da Universidade.

Teste de Agregação Plaquetária:

Voluntários saudáveis tiveram 20mL de sangue coletados por punção venosa e imediatamente misturados na proporção de nove partes de sangue para uma de citrato sódico 0,129 M. O sangue foi centrifugado a 200 g, a 20°C, por 15 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) após a coleta do PRP as amostras retornaram para a centrífuga e foram novamente centrifugados a 2000 g, a 20°C por mais 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) (Weiss & Rogers, 1972).

Foi utilizado para a contagem de plaquetas analisadas Coulter Counter CBC5 (Coulter Electronics, Luton, Inglaterra) e estas foram ajustadas para uma concentração final de $2,5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ com o PPP, a contaminação por outros tipos celulares foi inferior a 5%. (Weiss & Rogers, 1972.)

A adenosina 5'-difosfato (ADP) na concentração de 1 mM foi utilizada no grupo controle. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi testado nas doses de 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,015; 0,005 e 0,001 $\mu\text{g/mL}$ a PLA₂ foi utilizadas nas doses de 1; 0,25; e 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Os procedimentos foram executados com n=5.

Preparação da solução de plaquetas lavadas:

Amostras de sangue de voluntários foram coletadas com citrato de sódio 0,129 M, como já descrito.

A preparação de plaquetas lavadas foi efetuada como descrito por Pilla (1996). O sangue após ser coletado foi centrifugado a 160 g, por 10 minutos para a remoção do PRP. O PRP foi coletado e centrifugado a 1400 g por 10 minutos e o PPP foi descartado. O sedimento de plaquetas foi suspenso em tampão HEPES isosmolar contendo 3,5 mM HEPES, 142 mM NaCl, 2,5 mM KCl e 5,5 mM glicose. Após, a mistura de plaquetas homogenizadas no tampão, foi centrifugada a 1400g por 10 minutos e este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes.

Ensaio enzimático:

A atividade das E-NTPDases foi efetuada conforme descrito por Pilla (1996) e Rossato (2003). Foi utilizado um meio de incubação em que eram mantidas as condições ótimas para o funcionamento das enzimas contendo 5,0 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4,0

mM KCl, 50 mM glicose e tampão 50mM tris-HCl, ajustado para o pH 7,4 com um volume final de 200 μ L. Alíquotas de plaquetas lavadas em concentração de \sim 30 μ g de proteína eram adicionadas a reação e pré-incubadas por 10 minutos a 37°C. A reação era inicializada pela adição do substrato ATP ou ADP (1mM). Após 30 minutos de incubação, a reação era parada com a adição de 50 μ l de ácido tricloroacético 25%. Após este processo as amostras eram centrifugadas a 4°C, e alíquotas de 100 μ L adicionadas a 300 μ L de água de MilliQ eram utilizadas para o ensaio de liberação de fosfato inorgânico (Pi). Os controles de hidrólise não enzimática foram corrigidos com a adição da solução de plaquetas após a reação ter sido parada. Todas as amostras foram feitas em triplicata. A atividade enzimática foi expressa em nmol fosfato (Pi) liberado.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (media \pm EP) e n=5.

Para este experimento foi utilizado um pool de veneno de *Crotalus durissus terrificus* nas concentrações de 1 e 0,5 μ g/mL e PLA₂ nas concentrações de 1 e 0,25 μ g/mL. Estas doses foram selecionadas a partir da curva de agregação. A proteína da solução de plaquetas lavadas foi determinada pelo método de *Coomassie Blue* de acordo com a técnica descrita por Bradford (1976) a fim de corrigir a concentração de Pi liberado.

Quantificação do óxido nítrico (NO):

A dosagem foi realizada no sobrenadante das plaquetas submetidas ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* nas doses utilizadas no teste de agregação plaquetária, pela técnica descrita por Sastry (2002), formando um composto mensurado espectrofotometricamente em 545nm. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (media \pm EP) em=4.

Análise estatística:

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) para determinar se havia distribuição normal. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via (com índice de significância P<0.05) e posteriormente, foi utilizado pós-teste de Bonferroni utilizando o *software* SPSS 11.0 para *Windows*.

RESULTADOS

Cromatografias FPLC:

As cromatografias de amostras de veneno de São Paulo e do Rio Grande do Sul apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (frações) (figura 1). Os principais picos foram identificados como sendo convulxina (1), giroxina (2), crotoxina (3) e crotamina (4). O cromatograma da peçonha do RS apresentou duas proteínas (a e b) que estão ausentes no cromatograma da peçonha de SP.

Teste de capacidade agregante de plaquetas submetidas à peçonha de *Crotalus durissus terrificus*:

Foi utilizado ADP como agregante plaquetário (controle). Pode-se observar que na presença de veneno de *Crotalus durissus terrificus* na dose 1µg/mL ocorreu agregação plaquetária de forma tão efetiva quanto o ADP. Já nas doses entre 0,5 e 0,015µg/mL foi observada diferença significativa na agregação das plaquetas ($P < 0,05$), com um percentual de agregação entre 35 e 62%. Nas doses inferiores a 0,015 µg/mL a agregação variou entre 0,98 e 5,3%. Pode ser observada diferença significativa entre as doses (figura 2)

Níveis de NO nos sobrenadantes das plaquetas tratadas com veneno:

Não foi possível verificar alteração nos níveis de NO no sobrenadante das plaquetas submetidas à peçonha. Os níveis de NO das plaquetas nas doses utilizadas não tiveram diferença significativamente com relação ao grupo controle (sem peçonha).

Atividade de hidrólise de ATP e ADP na presença do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Ocorreu um aumento significativo ($P < 0,05$) das atividades E-NTPDases das doses do veneno quando comparado ao grupo controle, cabe salientar que não ocorreu diferença significativa na atividade de hidrólise do ATP entre as doses utilizadas (figura 4).

Também foi observado um aumento na atividade de hidrólise do ADP com relação ao grupo controle na atividade de hidrólise de ADP (figura 5).

Atividade agregante e antiagregante de plaquetas submetidas a PLA_2 .

A PLA_2 foi capaz de induzir agregação plaquetária apenas na dose de $1\mu\text{g/mL}$ (60%), mas a agregação nesta dose diferiu significativamente ($P < 0,05$) do grupo controle (ADP). Na concentração de $0,25\mu\text{g/mL}$ o valor foi em torno de 18% e em $0,1\mu\text{g/mL}$, 1% (Figura 6).

As plaquetas submetidas a diferentes doses de PLA_2 e ADP (1mM), tiveram diminuição significativa na capacidade de agregação com relação ao grupo controle nas doses de $0,25$ e $0,11\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) (Figura 7).

Atividade das NTPDases sobre a hidrólise de ATP e ADP na presença de PLA_2

Ocorreu um aumento significativo ($P < 0,05$) das atividades E-NTPDases das doses do veneno quando comparado ao grupo controle, cabe salientar que não ocorreu diferença significativa na atividade de hidrólise do ATP entre as doses utilizadas (figura 8).

Também foi observado um aumento na atividade de hidrólise do ADP com relação ao grupo controle na atividade de hidrólise de ADP (figura 9).

DISCUSSÃO

A partir das cromatografias foi possível identificar que o veneno de *Cdt*, proveniente do estado do Rio Grande do Sul, apresentou perfis cromatográficos semelhantes ao do veneno proveniente do estado de São Paulo. Comparando os dois perfis cromatográficos foi possível observar a presença de outros dois picos no veneno proveniente do estado do Rio Grande do Sul.

A presença destas alterações cromatográficas foi observada em outros trabalhos, como os desenvolvidos por Francischetti (2000) que investigaram a variabilidade protéica do veneno de *Cdt* do estado de Minas Gerais/Brasil com a peçonha de animais capturados em diferentes regiões do estado e observaram efeitos distintos dos venenos sobre a ação proteolítica e agregação plaquetária. Além disso, o trabalho também constatou alterações cromatográficas (através de FPLC) entre os animais capturados.

Outros estudos também apontam para variações na efetividade do veneno de serpentes dependendo do ambiente em que o animal reside, idade e sexo. Nos animais mantidos em cativeiro, a variação de tempo decorrido entre extrações de veneno pode provocar alterações qualitativas e quantitativas nas suas proteínas. (Chippaux et al, 1991; Furtado et al., 1991).

Em função dos venenos de cascavéis causarem CIVD e diversos distúrbios homeostáticos, foi avaliada a capacidade agregante plaquetária *in vitro* do veneno da *Cdt* do RS. O ADP foi utilizado no grupo controle de agregação, já que as plaquetas apresentam receptores específicos em suas membranas para se ligarem a ele (complexo glicoproteína IIb/IIIa) que aumentam o influxo de cálcio e ativam a adesão plaquetária. Além disso, nas plaquetas, o ADP também se liga a receptores metabotrópicos do tipo P2Y₁ e P2Y₁₂. O receptor P2Y₁ tem um papel crucial no início da ativação plaquetária induzida por ADP e colágeno, e o receptor P2Y₁₂ é o principal receptor com evidências genéticas e farmacológicas. Este receptor exerce um papel central na amplificação da agregação induzida por todos os conhecidos agonistas de plaquetas, os quais incluem colágeno, trombina, complexos imunes, TXA₂, adrenalina e serotonina (Hechler et al., 2005; Conley & Delaney, 2003). O P2Y₁₂ também está envolvido na potencialização da secreção plaquetária (Cattaneo et al., 2000).

Diferentes doses de veneno estimularam a agregação, pois o veneno de *Cdt* apresenta diversas frações com propriedades capazes de promover esta ação, como a convulxina e da crotoxina (Huntton et al, 1993).

A convulxina é uma proteína não enzimática com atividade seletiva sobre plaquetas sanguíneas e seu mecanismo de ação independe de cálcio, ADP, e cicloxigenase, provocando degranulação com liberação de ADP, ATP e cálcio (Vargrafitg et al., 1980; 1983; Francischetti et al., 1997). A afinidade da convulxina em reagir com as membranas plaquetárias não é inibida por outros agentes agregantes como alfa-trombina, fibrinogênio, colágeno, ADP, fator de ativação plaquetária, serotonina e epinefrina (Vargrafitg et al., 1980 e 1983; Prado-Franceschi, 1981; Alexander et al., 1988; Francischetti et al., 1997).

A crotoxina, fração formada por duas subunidades protéicas (PLA₂ e crotapotina) também apresenta atividade agregante plaquetária e coagulante (Fonseca et al., 2006). A subfração PLA₂ da crotoxina tem sido estudada como um dos fatores pelo qual a crotoxina pode apresentar capacidade de agregar plaquetas lavadas (Landucci et al., 1994; Beghini et al., 2000).

Em busca de um dos mecanismos pelo qual o veneno de *Cdt* causa agregação plaquetária, foram mensurados os níveis de óxido nítrico. O NO é capaz de inibir a agregação plaquetária *in vivo* e *in vitro*. Quando NO constitutivo plaquetário é inibido, a enzima guanilil-ciclase não é ativada e a fosfoinositol 3-quinase permite o influxo de cálcio para dentro das plaquetas, ativando a COX-1, possibilitando a adesão e a agregação plaquetária (Loscalzo, 2001).

Neste estudo não foi possível detectar uma diminuição nos níveis de NO em sobrenadantes de plaquetas, demonstrando que a capacidade agregante plaquetária induzida pelo veneno possivelmente não alterou a produção de NO.

Estudos como os de Ramamurthi (2001) demonstraram claramente que a diminuição dos níveis de NO e a inibição das NTPDases ativam a agregação plaquetária através de mecanismos de ação independentes. Para elucidar a capacidade agregante do veneno de *Cdt* a atividade das E-NTPDases foi investigada.

Nossos resultados demonstraram que as plaquetas humanas quando incubadas com a peçonha de *Cdt*, ao contrário do esperado, aumentaram a atividade específica das E-NTPDases e, conseqüentemente, aumentando a hidrólise dos nucleotídeos.

Esses resultados apresentaram em média quase 40% de aumento na atividade específica das E-NTPDases com relação à atividade de seus respectivos controles, tanto para ATP quanto para ADP (Engler, 1991; Kitakaze et al., 1991; Burnstock, 2006).

Recentemente tem sido observado um potente efeito antiagregante plaquetário da PLA₂, subfração protéica formadora da crotoxina. As PLA₂ de serpentes podem ser divididas em três grupos distintos, dependendo do tipo de efeito sobre a atividade plaquetária. A Classe A que inclui PLA₂ capazes de induzir agregação plaquetária, a classe B que inibem a agregação plaquetária induzida por agonistas fisiológicos e a classe C que são aquelas que apresentam propriedades tanto pró como antiagregantes plaquetária (Modesto et al, 2006).

Foi avaliado se a PLA₂ seria capaz de induzir agregação plaquetária ou inibir a atividade do ADP em agregar plaquetas humanas. Observou-se que a PLA₂ foi capaz de inibir a atividade agregante nas doses de 0,25 e 0,1µg/mL. Ouyang (1983; 1992) já relatou que o grupo de toxinas derivadas de venenos inibidoras de agregação plaquetária são enzimas que degradam o ADP liberado pelas plaquetas. Este mecanismo causa acumulação de adenosina a qual inibe competitivamente a agregação induzida pelo ADP.

A atividade das ectonucleotidases plaquetárias na presença de PLA₂ foi investigada e os resultados demonstraram que a PLA₂ foi capaz de aumentar a atividade das E-NTPDase, e, conseqüentemente, a hidrólise de ATP e ADP em diferentes doses, demonstrando que possivelmente seja a PLA₂ a proteína capaz de aumentar a hidrólise dos nucleotídeos nas plaquetas submetidas ao veneno de *Cdt*.

Em conclusão, observou-se que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* do estado do Rio Grande do Sul, apesar de ter diferido do perfil cromatográfico do *pool* de veneno de São Paulo, foi capaz de induzir a agregação plaquetária como já descrito para esta subespécie, evidenciando que os picos que diferenciaram o cromatograma do Rio Grande do Sul do cromatograma de São Paulo, possivelmente não interferem na ação do veneno sobre a agregação plaquetária.

Também é importante salientar que a capacidade de agregar plaquetas não se deve aos mecanismos que envolvem inibição de NO ou das E-NTPDases. Sugere-se que a PLA₂, subunidade protéica da crotoxina tenha sido a responsável por causar aumento na atividade de hidrólise dos nucleotídios ATP e ADP do veneno demonstrando que este pode ser o mecanismo da ação antiagregante plaquetário desta subfração.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, A. S., Melgarejo, A. R., Alves, C. R., Giovanni-de-Simone, S., 1997. Single-step purification of crotopotin and croctactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30, 25-28.
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26, 953-960.
- Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Sodek, L. C., 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracamboia) venom. *J Protein Chem.* 19(8), 679-684
- Bigonnesse, F., Levesque, S. A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S.C., Fernandes, M. J., Sevigny, J., 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43 (18), 5511-5519.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-256.
- Burnstock, G., 1990. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *Journal of Hypertension Suppl.* 8 (7), 95-106
- Cattaneo, M., Lecchi, A., Lombardi, R., Gachet, C., Zighetti, M. L., 2000. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 101-106.
- Chippaux, J. P., Willian, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results e interpretation. *Toxicon* 29, 1270-1303.
- Coade, S. B., Pearson, J. D., 1989. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res.* 65, 531-537.
- Andre, P., LaRocca, T., Delaney, S. M., Lin, P. H., Vincent, D., Sinha, U., Conley, P. B., Phillips, D. R., 2003. Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis. *Circulation.* 108(21), 2697-2703.
- Colman, R. W., 1990. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J.* 4, 1425-1435.
- Engler, R.L., 1991. Adenosine the signal of life? *Circulation* 84, 952-954.
- Filho, A. A., Campolina, D., Dias, M. B., 2001. Ofidismo. *Toxicologia Clínica.* Belo Horizonte. São Paulo, Folium Editora, 229-237.
- Fonseca, F.V., Antunes, E., Morganti, R. P., Monteiro, H. S., Martins, A. M., Toyama, D. O., Marangoni, S., Toyama, M. H., 2006. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* 25(3), 183-192.

- Francischetti, I. M. B, Saliou, B., Leduc, M., Carlini, C. R., Hatmi, M., Randon, J., Faili A; Bon C., 1997. Convulxin, a potent platelet-aggregating from *crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon* v.8-35, 1217-1228.
- Francischetti, I. M. B, Gombarovits, M. E. C., Valenzuela, J. G., Carlini, C. R., Guimarães, J. A., 2000. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127, 23-36.
- Furtado, M. F. D., Colletto, G. M. D. D, Silva, W. D., 1991. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. *Memórias do Instituto Butantan* 52-2,149-159.
- Garcia, F., Toyama, M. H., Castro, F. R., Proença, P. L., Marangoni, S., Santos, L. M., 2003. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon*. 42-4, 433-437.
- Hechler, B., Cattaneo, M., Gachet, C., 2005. The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost*. 31, 150–161.
- Huntton, R. A., Warrel, D. A., 1993. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Haemostasis and thrombosis*. 7, 176-189.
- Jorge, M. T., Ribeiro, L. A., 1990. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. *Ver. Ass. Med. Bras*. 36, 66-77.
- Kirley, T. L., 1997. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem*. 272 (2), 1076-1081.
- Kitakase, M., Hori, M., Sato, H., Takashima, S., Inoue, M., Kitabatake, A., et al., 1991. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res*. 69, 1402-1408.
- Landucci, E. C., Condino-Neto, A., Perez, A. C., Hyslop, S., Corrado, A. P., Novello, J. C., Marangoni, S., Oliveira, B., Antunes, E., de Nucci, G., 1994. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon*. 32(2), 217-26.
- Lavoie, E. G., Kukulski, F., Levesque, S. A., Lecka, J., Sevigny, J., 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohidrolase-3. *Biochem Pharmacol*. 67 (10), 1917-1926.
- Loscalzo, J., 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 88(8), 756-762.
- Miyabara, E. H., Toste, R. C., Selistre-de-Araujo, H. S., Aoki, M. S., Moriscot, A. S., 2004. Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin *in vivo*. *Toxicon*. 43, 425-432.
- Albuquerque Modesto, J. C., Spencer, P. J., Fritzen, M., Valença, R.C., Oliva, M. L., da Silva, M. B., Chudzinski-Tavassi, A. M., Guarnieri, M. C., 2006. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from Bothrops erythromelas venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 72(3),377-384.
- Ouyang, C., Huang, T. F., 1983. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* 21(4), 491-501.

- Ouyang, C., Teng, C. M., Huang, T. F., 1992. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*. 30(9), 945-66.
- Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S. S., Battastini, A. M. O., Dias, R. D., Sarkis, J. J. F., 1996. ATP diphosphohydrolase Activity (Apyrase, Ec 3.6.1.5) In Human Blood Platelets. *Platelets* 7, 225-230.
- Prado-Franceschi, J., Tavares, D. Q., Hertel, E. A., 1981. Convulxim efect, a toxin from rattlesnake venom, on plateteletes and leukocytes of anesthetized rabbits. *Toxicon* 19, 661-665.
- Ramamurthi, A., Robson, S. C., Lewis, R. S., 2001. Effects of nitric oxide (NO) and soluble nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) on inhibition of platelet deposition in vitro. *Thromb Res*. 102(4), 331-41.
- Rossatto, E. R., da Silva, L. B., Pereira, G.S., Bonan, C.D., Battastini, A.M., Ribeiro, J.P., Sarkis, J. J., 2003 ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. *Platelets* 14(1), 47-52
- Sampaio, S. C., Rangel-Santos, A. C., Peres, C. M., Curi, R. Cury, Y., 2005. Inhibitory effect of phospholipase A2 isoalted from crotalus durissus terrificus venom on macrophage function. *Toxicon* 45, 671-676.
- Sastry, K. V., Moudgal, R. P., Mohan, J., Tyagi, J. S., Rao, G. S., 2002. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Anal Biochem*. 306(1),79-82.
- Vargafitg, B. B., Prado-Franceschi, J., Chignard, M., Lefort, J., Marlas, G. E., 1980. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *J. Pharmac*. 68, 451-460.
- Weiss, H.J., Rogers, J., Thrombocytopathia Due to Abnormalities in Platelet: Release Reaction-Studies on Six Unrelated Patients Blood, Vol. 39, No. 2 (February), 1972
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res*. 52, 46-56.
- Zimmermann, H., 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci*. 20(6), 231-236.

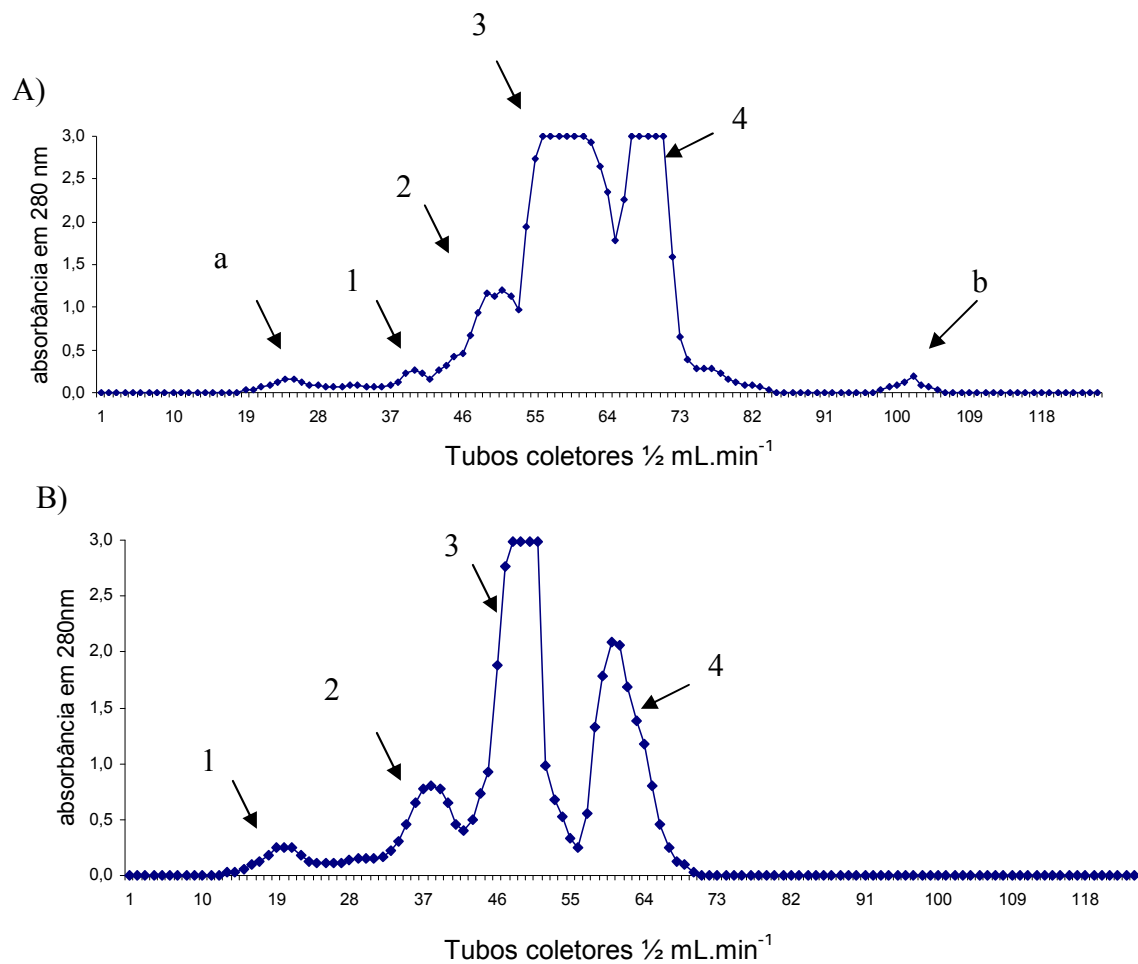


Figura 1: Representação gráfica dos cromatogramas em FPLC de pool do veneno de *Crotalus durissus terrificus* de serpentes coletadas no Rio Grande do Sul (A) e de São Paulo (B). Os “♦” indicam o valor da absorbância da leitura em 280nm de cada um dos tubos de coleta. As setas numeradas nos gráficos apontam para as principais proteínas formadoras da peçonha. Sendo elas: 1-convulxina, 2-giroxina, 3-crotoxina e 4-crotamina. Em A ainda aparecem 2 picos não identificados (a e b).

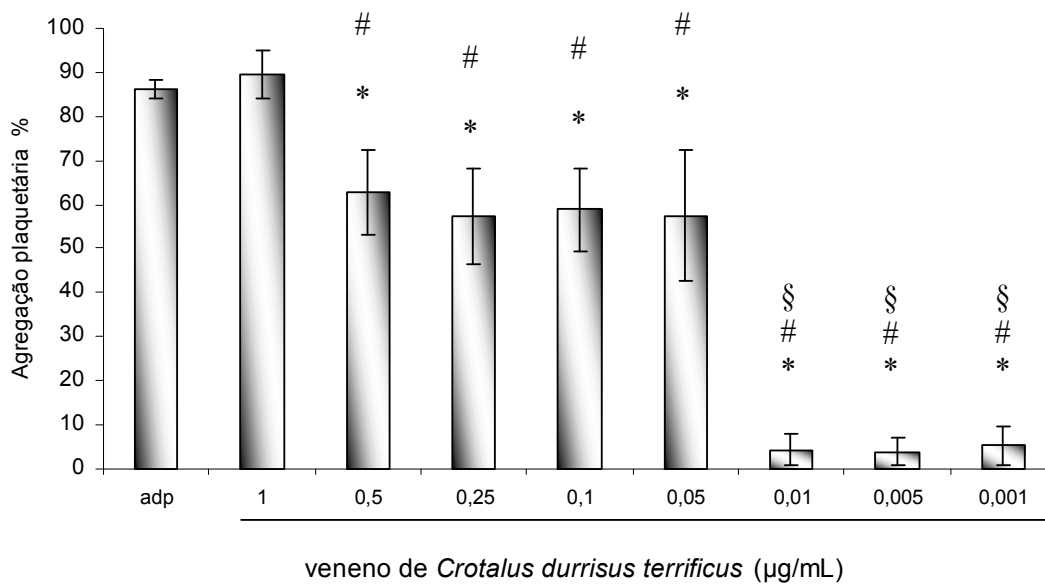


Figura 2: Agregação de PRP tratados com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Os * representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle (ADP 1mM), o # indica diferença estatística entre as doses com relação a dose de 1µg/ml, além disso ocorre diferença entre as doses entre 1 e 0,05 µg/ml das doses inferiores a 0,05 µg/ml (§) ($P < 0,05$). Os dados representam média±EP e n=4.

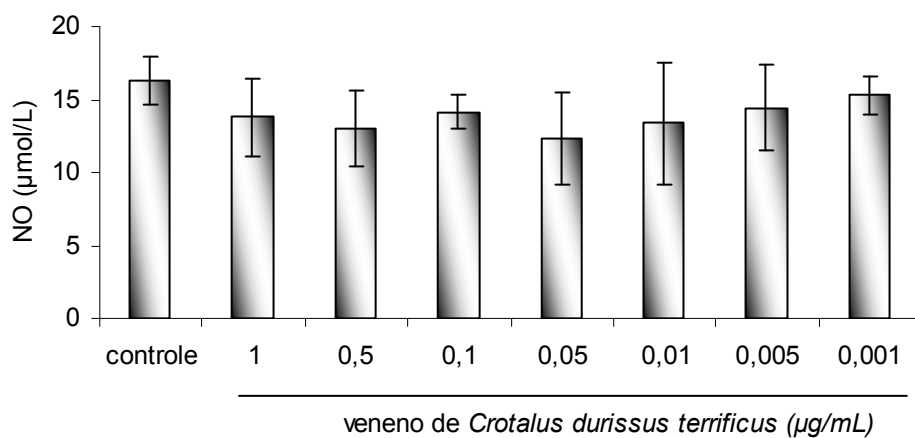


Figura 3: Níveis de óxido nítrico do sobrenadante das plaquetas tratadas com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Não foi observada diferença estatística nos grupos com a peçonha em comparação ao grupo controle. Os dados representam média±EP e n=5.

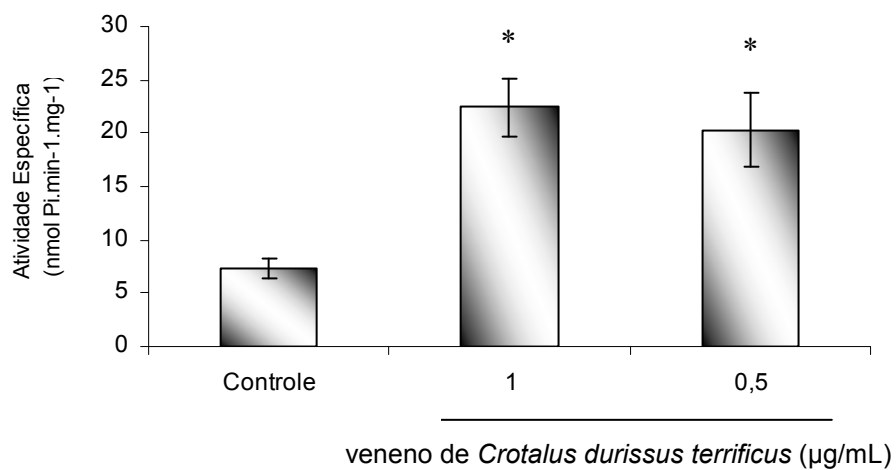


Figura 4: Influência de diferentes concentrações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a hidrólise de ATP em plaquetas lavadas. Os asteriscos (*) representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=5$.

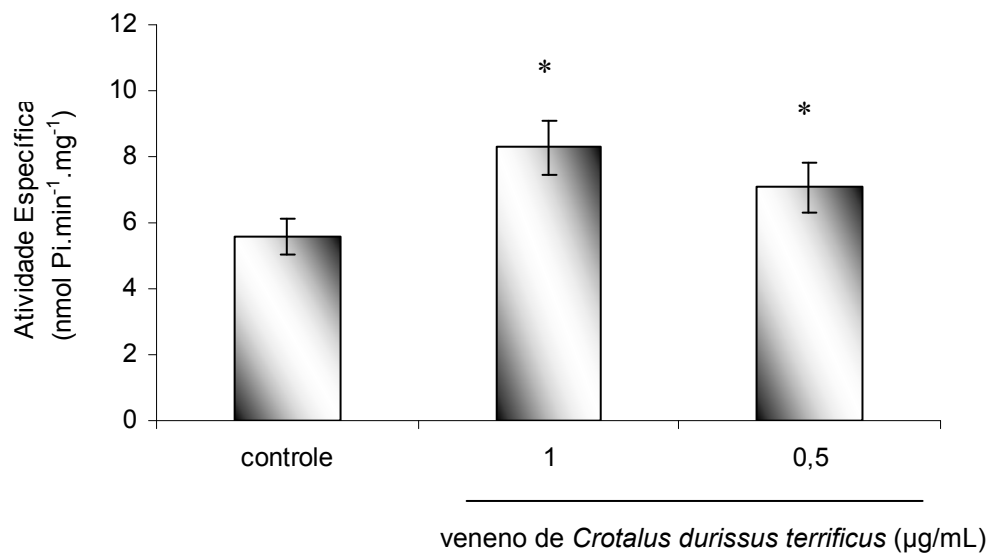


Figura 5: Influência de diferentes concentrações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a hidrólise de ADP em plaquetas lavadas. Os asteriscos (*) representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=5$.

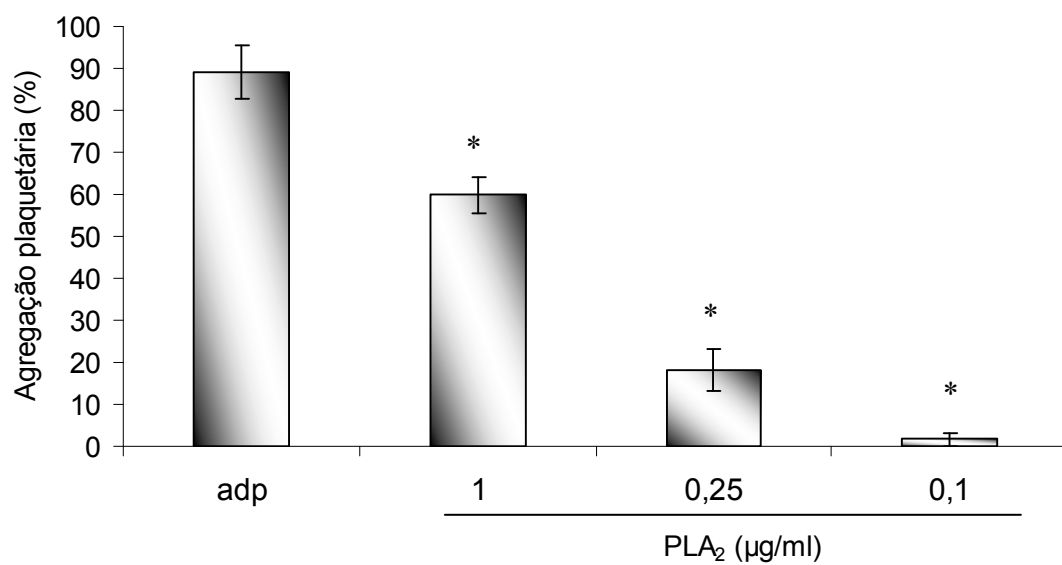


Figura 6: Agregação de PRP tratados com PLA₂. Os * representam diferença estatística significativa quando comparadas com o grupo controle (ADP, 1mM) (P<0,05). Os dados representam média±EP e n=4.

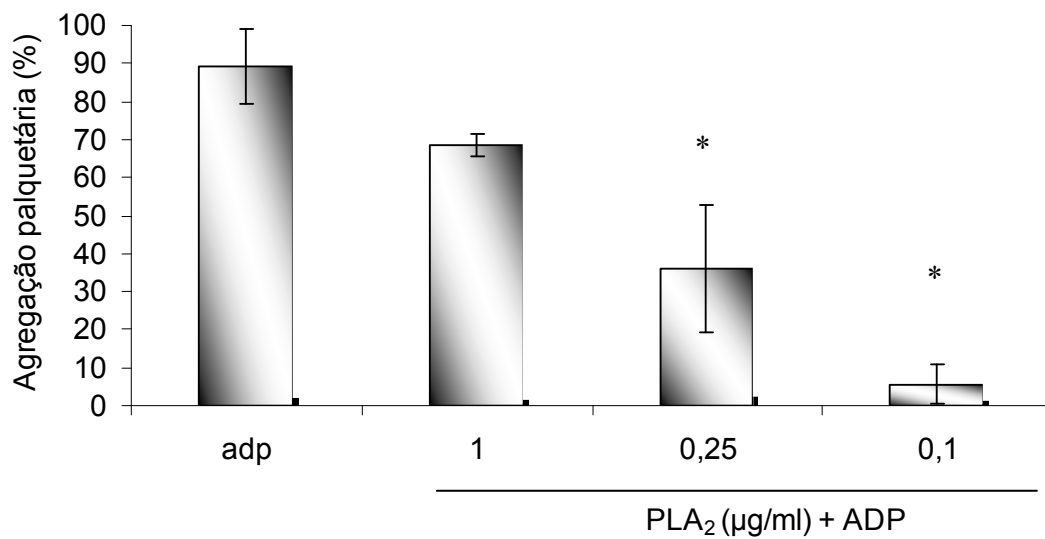


Figura 7: Agregação de PRP tratados com PLA₂ e ADP (1mM). Os * representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle (ADP) (P<0,05). Os dados representam média±EP e n=5.

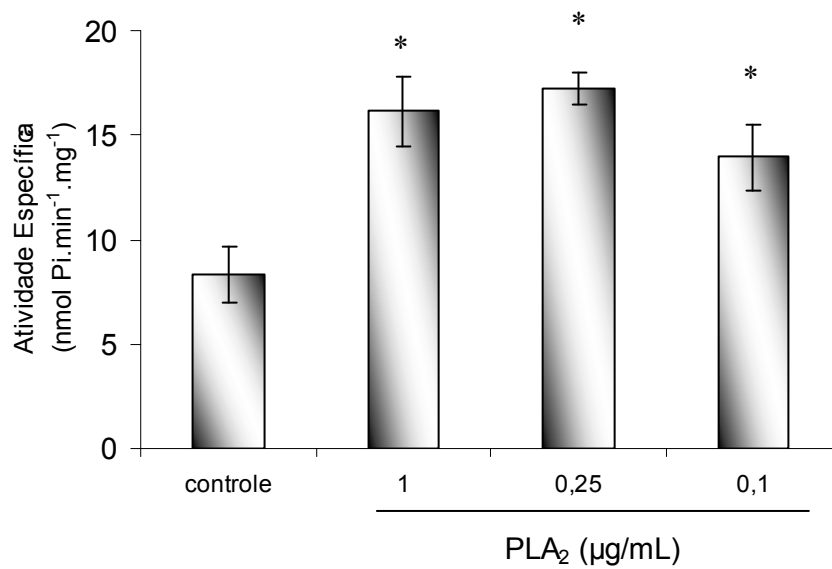


Figura 8: Influência de diferentes concentrações de PLA₂ sobre a hidrólise de ATP em plaquetas lavadas. Os asteriscos (*) representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=5$.

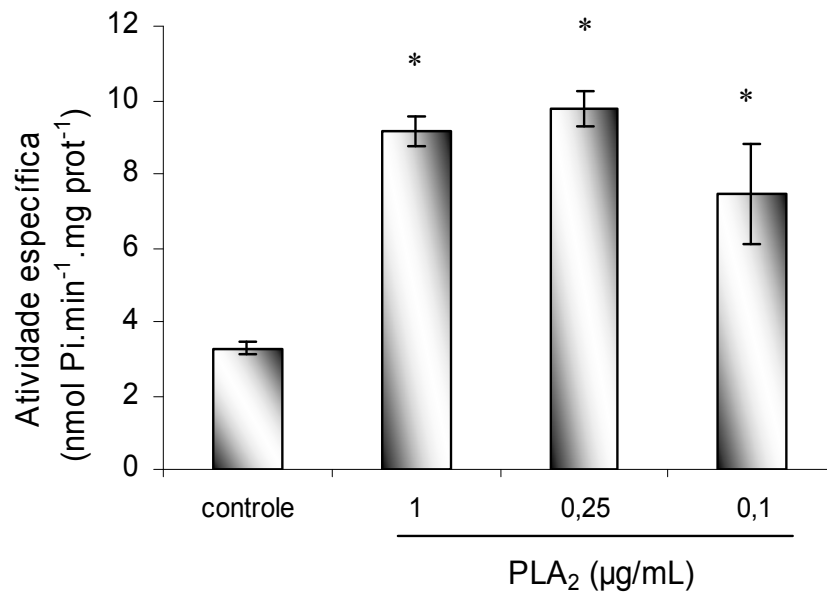


Figura 9: Influência de diferentes concentrações de PLA₂ sobre a hidrólise de ADP em plaquetas lavadas. Os * representam diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e $n=5$.

ARTIGO 2

“Avaliação da capacidade imunomoduladora e inflamatória das frações PLA₂ e Crotapotina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre células mononucleares de sangue periférico humano”

Carolina Maria Alves Bastos¹. Patrick Jack Spencer². Marcos Azambuja¹. Liamara Andrade³. Eduardo Caberlon¹. Maria Lúcia Machado Alves⁴. Moema Leitão de Araujo⁴.
Rosélia Mengue Dimer Rubin¹. Jarbas Rodrigues de Oliveira¹

¹ Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS, Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo - SP, Brasil

³ Laboratório de Química Farmacêutica. Faculdade de Farmácia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil.

⁴ Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil

“Avaliação da capacidade imunomoduladora e inflamatória das frações PLA₂ e Crotapotina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre células mononucleares de sangue periférico humano”

RESUMO

As ações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) podem induzir alterações hematológicas, imunológicas e ativar a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Algumas frações do veneno de *Cdt* também apresentam um efeito estimulatório ou inibitório sobre o sistema imune e respostas inflamatórias. A crotoxina é uma fração com atividade neurotóxica do veneno de *Cdt* é composta por duas subunidades: subunidade básica ou fosfolipase A₂ (PLA₂), que hidrólisa fosfolipídios das membranas celulares e ativa inflamação, e a subunidade ácida ou crotapotina, descrita até recentemente, como intensificadora da atividade da PLA₂, mas que também apresenta atividade antiinflamatória *in vivo*. O fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α), em função destas manifestações, se torna um excelente candidato para investigar as ações de venenos animais, pois é hábil em ativar ou suprimir um vasto número de genes responsáveis pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, sendo considerado um dos melhores mediadores de resposta inflamatória. Tendo em vista a gravidade de efeitos ocasionados por acidentes ofídicos e as alterações causadas pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, procuramos estudar como as duas subunidades formadoras da crotoxina, a crotapotina e a fosfolipase A₂, podem apresentar efeitos antiinflamatório e inflamatório respectivamente. Foram utilizadas neste estudo diferentes doses de PLA₂ e crotapotina e incubadas em cultura de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) em ensaios de proliferação linfocitária com o uso de fitohemaglutinina (PHA) e citotoxicidade. Também foi avaliada a liberação de TNF- α pelas PBMCs. Verificamos que a crotapotina tem a capacidade de diminuir a proliferação celular e modular a resposta inflamatória *in vitro*, verificada pela diminuição dos níveis de TNF- α , sem apresentar toxicidade sobre PBMCs. Foi observado que a PLA₂ foi capaz de aumentar os níveis expressos de TNF- α pelas PBMCs mas não causou morte celular nem aumento significativo na proliferação celular nas células estimuladas com PHA. Foram verificados efeitos contrários entre as duas subunidades formadoras da proteína crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Tendo em vista que quando a crotapotina esta associada à PLA₂ é relatada na literatura a intensificação das atividades inflamatórias causadas pela PLA₂, é interessante demonstrar que a esta subfração possui atividade antiinflamatória diminuindo a proliferação celular e a expressão de TNF- α , enquanto que a PLA₂ mantém a atividade inflamatória estimulando fatores da cascata de inflamação como os níveis de TNF- α em células mononucleares de sangue periférico humano.

Palavras-chaves: crotapotina, veneno de *Crotalus durissus terrificus*, PLA₂, TNF- α , citotoxicidade, proliferação

INTRODUÇÃO

Atualmente são identificadas no mundo aproximadamente três mil espécies de serpentes, sendo que cerca de 12% são consideradas peçonhentas. Apesar do homem não ser uma das presas alimentares destes animais, a forte ação antrópica em ambientes naturais acaba aumentando o contato acidental de seres humanos com serpentes. (Méier et al., 1984; Pinho et al., 2000; Pinho et al., 2004). No Brasil são registradas cerca de 250 espécies de serpentes, distribuídas em 75 gêneros, dos quais quatro têm importância médica: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (Pinho et al., 2000). O gênero *Crotalus* é responsável, sozinho, por 1,8% da letalidade em acidentes com serpentes, enquanto que todos os outros gêneros somados causam apenas 1,6% (Pinho et al., 2000; Cardoso et al., 2003). Este gênero é representado por apenas uma espécie no país, *Crotalus durissus*, e distribuídas em cinco subespécies, entre elas a subespécie *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) (Jorge & Ribeiro, 1990).

As ações do veneno de *Crotalus* podem induzir alterações hematológicas, coagulatórias e imunológicas e, além disso, podem ativar a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Após a picada de *Cdt* são relatadas reações sistêmicas incluindo choque, distúrbios do sistema nervoso central, problemas hepáticos e falência respiratória. Voronov (1999), afirma que os efeitos do veneno, por suas propriedades citotóxicas, podem levar a um quadro de falência múltipla de órgãos (Hutton & Warrel, 1993). Algumas frações do veneno de *Cdt* também apresentam um efeito estimulatório ou inibitório sobre o sistema imune e respostas inflamatórias (Sampaio et al. 2005).

As principais toxinas formadoras do veneno de *Cdt* são a crotoxina, crotamina, convulsiva e giroxina (Alexander et al., 1988).

A crotoxina é uma fração com atividade neurotóxica pré-sináptica do veneno de *Cdt*. Esta toxina é composta por duas subunidades denominadas: subunidade básica, que possui atividade fosfolipásica A2 (PLA₂) e cataliza a hidrólise do acil-éster na posição sn-2 dos fosfolípidios, apresentando intensa toxicidade, e a subunidade ácida ou crotapotina, descrita até recentemente, como intensificadora da atividade da subunidade básica (Aguiar et al., 1997; Miyabara et al., 2004).

Injeções subcutâneas em cobaias de veneno de *Cdt* provocam uma rápida liberação de interleucina (IL)-6 no soro (de 3-6 horas após a administração), retornando aos valores

normais em 12 horas. Todos os venenos de ação miotóxica fosfolipásica A2 são capazes de induzir um aumento sistêmico de IL-6, sugerindo uma resposta imune indireta, provavelmente iniciada pelo dano tecidual local (Voronov, 1999).

A PLA₂ é um estimulador de processos inflamatórios, além de promover o aumento de ácido aracdônico (AA) da membrana dos fosfolipídios e assim estimular a síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, é naturalmente sintetizada no organismo e detectada em casos de inflamação graves como sepse, disfunção de múltiplos órgãos, queimaduras, entre outros problemas, sendo reconhecida por participar ativamente no processo de lesão e agravamento de patologias (Sampaio et al, 2003).

A crotapotina, subunidade ácida da crotoxina é uma proteína que intensifica a atividade da PLA₂, quando associadas, mas que quando isolada possui atividade antiinflamatória *in vivo*, apresentando inibição do edema de pata induzido por carragenina (Landucci et al., 1995). A crotapotina também demonstrou suprimir a cicloxigenase (COX) 2 e suprimir a divisão de leucócitos quando adicionada em cultura celular (Garcia et al., 2003).

Os componentes de venenos de serpentes podem provocar liberação de agentes pró-inflamatórios endógenos e causar extensos danos teciduais e sistêmicos. O fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α), em função destas manifestações, se torna um excelente candidato para investigar as ações de venenos animais (Moura-da-Silva et al. 1996). O TNF é capaz de produzir uma grande variedade de efeitos e é hábil em ativar ou suprimir um vasto número de genes responsáveis pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias, mediadores e proteínas de fase aguda. Cabe salientar ainda que muitas das ações produzidas pelo TNF- α são muito semelhantes às ações da IL-1. O TNF é considerado um dos melhores mediadores de resposta inflamatória (Nathan & Porteu, 1990).

A toxicidade celular é um dos melhores mecanismos para se predizer a toxicidade de substâncias sobre diferentes tecidos. É recomendado testar diversas substâncias em testes celulares *in vitro*, por esses terem uma ótima correlação entre o que pode ser observado e a real atuação e mecanismos metabólicos envolvidos em determinados estados fisiológicos alterados. Tecnicamente falando, existem muitas vantagens em se trabalhar com testes *in vitro*, aos tradicionais ensaios *in vivo* com a utilização de animais experimentais. Testes *in vitro* são mais sensíveis, econômicos e apresentam uma resposta

mais homogênea, permitindo uma melhor comparação entre resultados executados, por exemplo, em laboratórios distintos (Purchase al, 1998).

Tendo em vista a gravidade de efeitos ocasionados por acidentes ofídicos e as alterações causadas pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, procuramos estudar como as duas subunidades formadoras da crotoxina, a crotapotina e a fosfolipase A₂, podem apresentar efeitos antiinflamatório e inflamatório respectivamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes:

RPMI 1640, Fitohemaglutinina (PHA) foram adquiridas da Nycomed Pharma (Norway), Histopaque 1077 foi obtido do Sigma Aldrich, (Sr Lois, EUA). Garamicina 2,7mg/mL da Schering-Plough (Brazil). MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) da Acros Organica (USA).

Venenos:

Fosfolipase A₂ e Crotapotina foram purificadas em FPLC do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e gentilmente cedidas para a execução deste trabalho pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN).

As amostras foram dissolvidas em meio de cultura RPMI 1640 estéril, preparado conforme instruções do fabricante, no momento do uso.

Amostras de sangue periférico humano:

Este estudo foi desenvolvido com o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Todos os voluntários incluídos no estudo receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tiveram 20mL de sangue periférico coletado por punção venosa. Este trabalho está autorizado sobre o registro número 0018/05, do comitê de ética da Universidade.

Cultura de Células:

Foram realizados, *in vitro*, teste de citotoxicidade (Oliveira et al., 2002), e linfoproliferação de células mononucleares humanas, retiradas por punção venosa de voluntários jovens adultos, sadios e após terem assinado termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os reagentes de uso foram filtrados em unidades estéreis descartáveis de 0,22µm (Millex). As PBMCs, foram isoladas por gradiente de centrifugação. Um total de 15 mL de sangue total heparinizado foi diluído 1:2 com solução fisiológica de NaCl 0,9%. Este homogeneizado foi fracionado em porções de 7 mL, e a ele adicionado 3 mL de Histopaque; centrifugado a 800g por 20 minutos. As células mononucleares foram

coletadas e lavadas com tampão salino fosfato (PBS). As PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado por gamicina (Schering-Plough) 2,7mg/mL e a densidade celular final foi ajustada em $1,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹ com 20% de soro homólogo (previamente desnaturado em banho-maria a 60°C por 45 minutos) e 80% do meio suplementado.

Determinação da Capacidade Proliferativa das PBMCs submetidas a Crotopotina e a PLA₂:

Para o teste de proliferação linfocitária, foi utilizado fitohemaglutinina 10µg/mL (Sigma) como mitógeno. As culturas foram preparadas em microplacas (Nunc) de fundo chato com 96 poços em ambiente estéril de capela de fluxo laminar (Veco). As células mononucleares foram plaqueadas com diferentes concentrações das frações crotopotina e PLA₂ do veneno de *Cdt* - na presença do mitógeno. As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Sanyo) de atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono por um período de 96 horas.

A proliferação linfocitária foi determinada pelo teste de MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) segundo descrito por Mosmann, (1983). O MTT foi dissolvido em RPMI 1640 a 5 mg/mL e adicionado a todos os poços do ensaio, após três horas de incubação, o sobrenadante foi descartado. Isopropanol (Quimex) foi adicionado aos poços e, com o auxílio de micropipeta (Eppendorf) o isopropanol foi homogeneizado na placa até a dissolução dos cristais de furazam formados pela reação do MTT. Após cinco minutos, os poços foram submetidos à leitura fotométrica em leitor de microplacas (Hyperion MicroReader) a 540nm, com comprimento de onda de referência de 650nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, com as células isoladas do sangue de quatro voluntários. Os resultados são expressos em média das densidades ópticas ± erro padrão da média (média ± EP).

Para a análise da ação da crotopotina e da PLA₂ foram estudados os 7 grupos.

1. controle de PBMCs sem PHA;
2. controle de PBMCs com PHA (para verificar se o mitógeno está ativo);
- 3 a 7. PBMCs com PHA e diferentes doses de crotopotina e PLA₂, sendo que ambas as toxinas foram incubadas nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,2 e 0,1 µg/mL.

Avaliação da Citotoxicidade das PBMCs submetidas a Crotopotina e a PLA₂:

A viabilidade celular foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer através da técnica de exclusão com azul de tripan 0,2% (Sigma), sendo aceita viabilidade igual ou superior a 90% no grupo controle (CELIS, 1998).

Todos os experimentos foram feitos em triplicata, incubadas por 96 horas, com as células isoladas do sangue de quatro voluntários. Os resultados são expressos em média de número total de células \pm erro padrão da média (média \pm EP).

Para a análise da crotopotina e da PLA₂ foram estudados 6 grupos.

1. controle de PBMCs (onde a viabilidade mínima para participar do experimento foi $\geq 90\%$);

2 a 6: PBMCs incubadas com diferentes doses de crotopotina e PLA₂, sendo que ambas as toxinas foram encubadas nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,2 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Foram utilizadas as mesmas doses do experimento de linfoproliferação para que pudesse ser correlacionada a possível atividade imunomoduladora/linfoproliferativa com a citotoxicidade.

Medida dos níveis de TNF- α :

A expressão de TNF- α foi mensurada com a utilização de kit comercial Immulite 1000 (Immulite Automated Analyses - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) de acordo com as normas do fabricante. Os níveis de TNF- α foram quantificados no sobrenadante das culturas estimulada com PHA após 96 horas de incubação no ensaio de linfoproliferação. Para este tempo de incubação, o kit indica níveis expressos de TNF- α em torno de 7500 pg/mL nos controles de células estimuladas com o mitógeno PHA.

Análise estatística;

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) para determinar se havia distribuição normal. A variância estatística foi analisada pelo teste ANOVA de uma via (com índice de significância: $P < 0.05$) foi utilizado pós-teste de Bonferroni utilizando o *software* SPSS 11.0 para *Windows*.

RESULTADOS

Ensaio de linfoproliferação e citotoxicidade das frações sobre as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

Crotapotina:

Na investigação do efeito sobre a proliferação linfocitária, foi observado que a crotapotina foi capaz de inibir a ação mitótica da PHA nas doses de 0,2 e 0,1 μ g/mL ($P < 0,05$), imunomodulando a proliferação (figura 1).

Para determinarmos se a diminuição na proliferação foi realmente em função da ação da crotapotina e não de uma possível toxicidade sobre as células, verificamos a viabilidade das células incubadas por 96 horas e não foi constatada diferença significativa em relação ao controle de células (figura 2).

PLA₂:

O efeito proliferativo foi investigado, na presença de PLA₂, mas não foi verificada nenhuma ação sobre proliferação celular (figura 3 e 4), já que na presença do mitógeno não foi constatado um aumento na proliferação, e este aumento também não foi observado nas células incubadas somente com PLA₂. Também foi verificada a viabilidade das células incubadas em 96 horas com a PLA₂ e não foi observada morte celular (figura 4).

Avaliação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α):

Os níveis de TNF- α foram mensurados através do teste de medida quantitativa *in vitro*. O sobrenadante das culturas dos ensaios de linfoproliferação após 96 horas foi coletado, centrifugado e armazenado a -80°C até a realização do ensaio.

Os níveis de TNF- α no sobrenadantes das culturas incubadas com crotapotina apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na concentração do TNF- α quando comparados com o grupo controle de fitohemaglutinina (figura 5) enquanto que nas culturas com PLA₂ ocorreu um aumento significativo nos níveis de TNF- α . ($P < 0,01$) (figura 6).

DISCUSSÃO

O veneno de *Cdt* é formado por cinco grandes proteínas, a crotoxina, crotamina, convulsiva e giroxina, além de metaloproteases e outros peptídeos biologicamente ativos. (Alexander et al., 1988).

A crotoxina é composta por duas subunidades, uma básica (PLA₂) que apresenta intensa toxicidade, e a subunidade ácida (crotapotina) (Aguilar, 1997).

A PLA₂ é uma enzima lipolítica que catalisa a hidrólise do acil-éster na posição sn- dois dos fosfolipídios. Foi demonstrado que lesões causadas por *Cdt* são induzidas por um aumento na liberação de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda (Miyabara et al., 2004). Esta proteína, além de seu efeito inflamatório atuando sobre citocinas, também pode levar a formação de edema, agregação plaquetária, cardiotoxicidade e ação anticoagulante (Lambeau e Lazdunski, 1999)

A crotapotina, subunidade ácida da crotoxina, isoladamente atua como uma proteína chaperona da PLA₂ intensificando sua neurotoxicidade, mas diminuindo a atividade catalítica. (Soares et al., 2001). Já foi identificada que a crotapotina é o principal inibidor natural da PLA₂, mas possui atividade antiinflamatória *in vivo*, apresentando inibição do edema de pata induzido por carragenina (Landucci et al., 1995). A crotapotina também demonstrou suprimir a COX2 e apresentou a supressão da divisão de leucócitos quando adicionada em cultura celular. A crotapotina atua também como agente antiinflamatório, estimulando macrófagos a produzirem PGE2 e conseqüentemente reduzindo a resposta proliferativa (Garcia et al., 2003).

Pode-se verificar que a crotapotina diminuiu a capacidade de proliferação de PBMC's quando submetidas ao mitógeno fitohemaglutinina (figura 1), mas este efeito ocorreu apenas nas doses mais baixas tiveram ação antiproliferativas não é clara, porém podemos supor que deva ser um mecanismo semelhante utilizadas no experimento (0,1 e 0,2 µg/mL). Nestas mesmas doses não foi verificada toxicidade (fig. 2), indicando uma inibição da crotapotina diretamente no mecanismo de proliferação celular estimulado pelo mitógeno PHA. Também foi observado um decréscimo na produção de TNF- α nestas mesmas doses (figura 5). A razão pela qual apenas as doses mais baixas tiveram ação antiproliferativa não é clara, porém podíamos supor que se deva a um mecanismo

semelhante à chamada “janela terapêutica de fármacos” onde existe uma dose ideal para produzir o efeito desejado (Toshiaki et al., 1993).

O TNF- α é uma potente pró-inflamatória catequina produzida por neutrófilos, linfócitos T e B ativados, astrócitos, células endoteliais, entre outros tipos celulares. Tem a capacidade de estimular praticamente todos os mediadores inflamatórios, tais como: interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e metabólitos derivados do AA e, em adição, induz sua própria síntese em macrófagos (Moura-da-Silva et al. 1996; Garcia, 2003).

Esta diminuição que observamos na produção de TNF- α pode estar diretamente relacionada à íntima relação da crotapotina com o reportado efeito antiinflamatório e alguns produtos do AA. O AA é pode ser convertido por distintos caminhos a COX1 e COX 2 e eicosanoides envolvidos na resposta inflamatória. Esses produtos do AA podem ativar a expressão de TNF- α e citocinas inflamatórias (Garcia et al., 2003), a crotapotina por sua vez, pode inibir a formação de da cicloxigenases e diminuir a expressão de citocinas que atuam na cascata inflamatória (Landucci et al., 1995).

Nos experimentos de proliferação celular PLA₂ não foi constatado um aumento na proliferação na presença do mitógeno (figura 3), também não foi observada morte celular nas doses utilizadas no experimento (figura 4) (Garcia et al., 2003).

Como a PLA₂ é reportada como agente inflamatório, buscamos de um mecanismo que justificasse esta propriedade. Avaliamos a liberação de TNF- α pelas células e foi constatado um aumento significativo na expressão de TNF- α pelas PBMC's quando submetidas à PLA₂ (fig. 6).

Recentes estudos têm demonstrado que injeções de crotoxina em ratos levam a um aumento no TNF- α conjuntamente com uma estimulação do eixo hipotalâmico e pituitário, consequentemente, também foi observado que a inibição da atividade da PLA₂ diminui a expressão do TNF em macrófagos (Costa et al., 2001).

O AA é produzido pela ação da PLA₂ sobre a membrana de fosfolipídios da maioria das células. O AA livre pode ser convertido através de diferentes caminhos enzimáticos a cicloxigenase (COX)-1 e COX-2 em eicosanoides envolvidos na resposta inflamatória. É bem estabelecida a indução da COX2 na biossíntese de prostaglandinas E2 (PGE2) por ativação de monócitos e macrófagos. PGE2 age como um potente vasodilatador e inibe a resposta induzida por mitógeno sobre linfócitos, desta forma prevenindo uma superestimulação da resposta imune celular (Sampaio et al., 2005).

O mecanismo inflamatório da PLA₂ geralmente é modulado por mediadores lipídicos, tendo em vista que a PLA₂ atua sobre os fosfoesfingolipídios. O ácido aracdônico derivado de eicosanoides, incluindo leucotrienos e tromboexano são potentes mediadores pró-inflamatórios, cuja ação é em parte mediada pela interação dos receptores de membrana celulares acoplados a proteína G, a inibição desta ligação pode interromper alguns passos da cascata inflamatória (Krönke, 2002).

Anthonsen e colaboradores (2001) sugerem que níveis de PLA₂ modulam a liberação de IL-1, TNF- α e a atividade do NFk-B durante uma reação inflamatória.

A PLA₂ é uma proteína presente na peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, mas também é uma proteína produzida endogenamente pelo organismo, suas concentrações tornam-se perceptíveis no soro durante disordens inflamatórias graves, disfunção de múltiplos órgãos, queimaduras, entre outras lesões. (Costa et al, 2000)

Neste trabalho foi verificado que a crotapotina tem a capacidade e diminuir a proliferação celular e modular a resposta inflamatória *in vitro*, verifica pela diminuição dos níveis de TNF- α , sem apresentar toxicidade sobre PBMCs. Foi observado que a PLA₂ foi capaz de aumentar os níveis expressos de TNF- α pelas PBMCs mas não causou morte celular nem aumento significativo na proliferação celular nas células estimuladas com PHA.

Verificamos efeitos contrários entre as duas subunidades formadoras da proteína crototoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Tendo em vista que quando a crotapotina esta associada à PLA₂ é relatada na literatura a intensificação das atividades inflamatórias causadas pela PLA₂, é interessante demonstrar que a crotapotina possui atividade antiinflamatória diminuindo a proliferação celular e a expressão de TNF- α , enquanto que a PLA₂ mantém a atividade inflamatória estimulando fatores da cascata de inflamação como os níveis de TNF- α em células mononucleares de sangue periférico humano.

REFERÊNCIAS:

Aguiar, A. S., Melgarejo, A. R., Alves, C. R., Giovanni-de-Simone, S., 1997. Single-step purification of crotopotin and crotoactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30, 25-28.

Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. Toxicon 26, 953-960.

Anthonsen, M. W., Solhaug, A., Johansen, B., 2001. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A2 modulates tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-induced NF-kappa B activation. J Biol Chem. 276 (32) 30527-30536.

Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad, J. R. V., 2003. Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. Ed. Savier, São Paulo, 6-12.

Celis, J., E., 1998. Cell biology - a laboratory handbook. 2ª ed. California, Academic Press, v.1.

Costa, L. A., Fornari, M. C., Berardi, V. E., Miles, H. A., Diez, R. A., 2001. In vivo effect of snake phospholipase A2 (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1alpha, TNF-alpha and IL-1ra level in humans. Immunology Letters, 75(2), 137-141.

Garcia, F., Toyama, M. H., Castro, F. R., Proença, P. L., Marangoni, S., Santos, L. M., 2003. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. Toxicon. 42-4, 433-437.

Huntton, R. A., Warrel, D. A., 1993. Action of snake venom components on the haemostatic system. Haemostasis and thrombosis. 7, 176-189.

Jorge, M. T., Ribeiro, L. A., 1990. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. Ver. Ass. Med. Bras. 36, 66-77.

Kronke, M., Adam-Klages, S., 2002. Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA(2) FEBS Lett, 531(1),18-22.

Landucci, E. C. T., Antunes, E., Donato, J. J., Faro, R., Hyslop, S., Marangoni, S., Oliveira, V., Cirino, G., De Nucci, G., 1995. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by crotopotin: a polypeptid complexed with phospholipase A2. Br. J. Pharmacol. 114, 578-583.

Lambeau, G., Lazdunski, M., 1999. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. Trends Pharmacol Sci. 20(4),162-170.

Meier, J., Stoker, K., 1984. Modification of the toxicity of Bothrops atrox poison by interventions in the coagulation and kallikrein system of prey. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 111(6), 877-882.

Miyabara, E. H., Toste, R. C., Selistre-de-Araujo, H. S., Aoki, M. S., Moriscot, A. S., 2004. Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin *in vivo*. Toxicon. 43, 425-432.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65, 55-63.

Moura-da-Silva, A. M., Laing, G. D., Paine, M. J. T., Politi, V., Crampbton, J. M., Theakston, R. D. G., 1996. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. Eur. J. Immunol. 26, 2000-2005.

Porteu, F., Nathan, C., 1990. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. J Exp Med. 172 (2), 599-607.

Oliveira, J. C. R., Montes, D. E., Oca, M., Duarte, M. M., Diniz, C. R., Fortes-Dias, C. L., 2002. Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. Toxicon 40, 321-325.

Pinho F. O., Vidal, E. C., Burdmann, E. A., 2000. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda em acidentes crotálicos. Jornal Brasileiro de Nefrologia 22-3, 162-168.

Pinho, F. M. O., Oliveira, E. S., Faleiros, F., 2004. Acidentes ofídicos no estado de Goiás. Revista da Associação Médica Brasileira 50-1, 93-96.

Purchase, I. F., Botham, P. A., Bruner, L. H., Flint, O. P., Frazier, J. M., Stokes, W. S., 1998. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. Toxicological Sciences 43(2), 86-101.

Sampaio, S. C., Rangel-Santos, A. C., Peres, C. M., Curi, R. Cury, Y., 2005. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from crotalus durissus terrificus venom on macrophage function. Toxicon 45, 671-676.

Soares, A. M., Mancin, A. C., Cecchini, A. L., Arantes, E. C., Franca, S. C., Gutierrez, J. M., Giglio, J. R., 2001 Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from Crotalus durissus terrificus snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. Int J Biochem Cell Biol. 33 (9). 877-888.

Voronov, E., Apte, R. N., Sofer, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. J. Venon Anim. Toxins. 5-1.

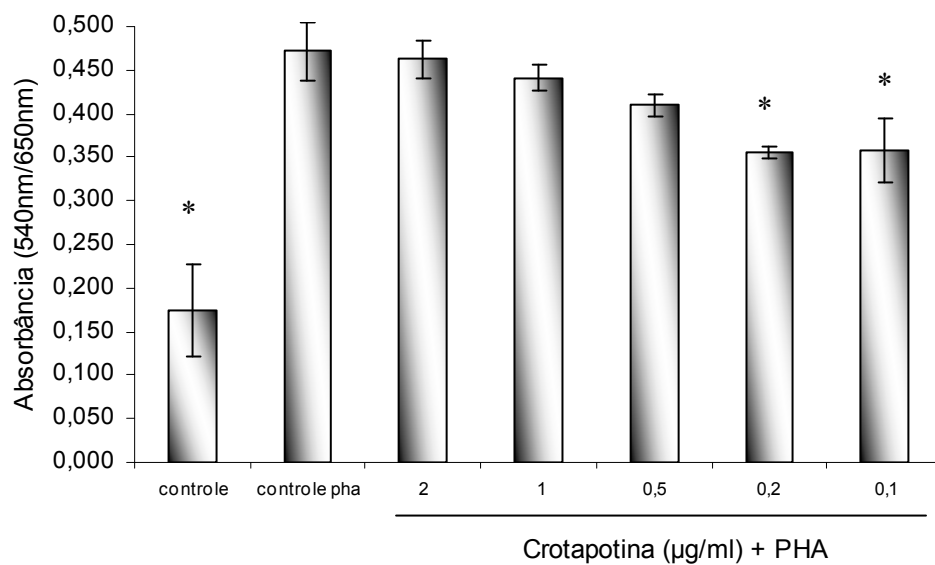


Figura 1: Influência de diferentes concentrações de crotapotina sobre a proliferação celular através do teste de MTT. O * representa significativa diferença estatística em relação ao grupo controle com PHA ($P < 0,05$). Os dados são representados pela média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=4$.

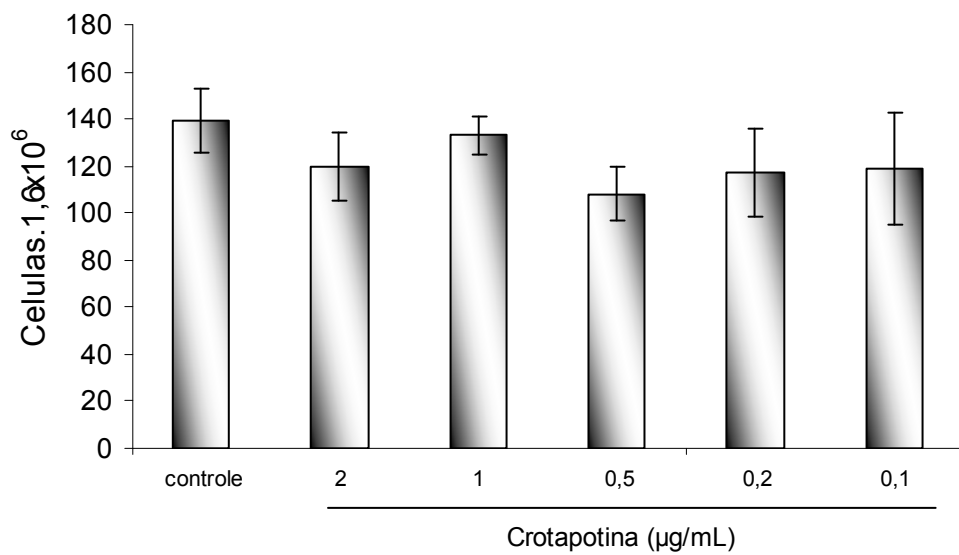


Figura 2: Influência de diferentes concentrações de crotopotina sobre a citotoxicidade celular pelo teste de exclusão com *tripan blue*. Não foi observada morte celular nas concentrações utilizadas. Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com n=4.

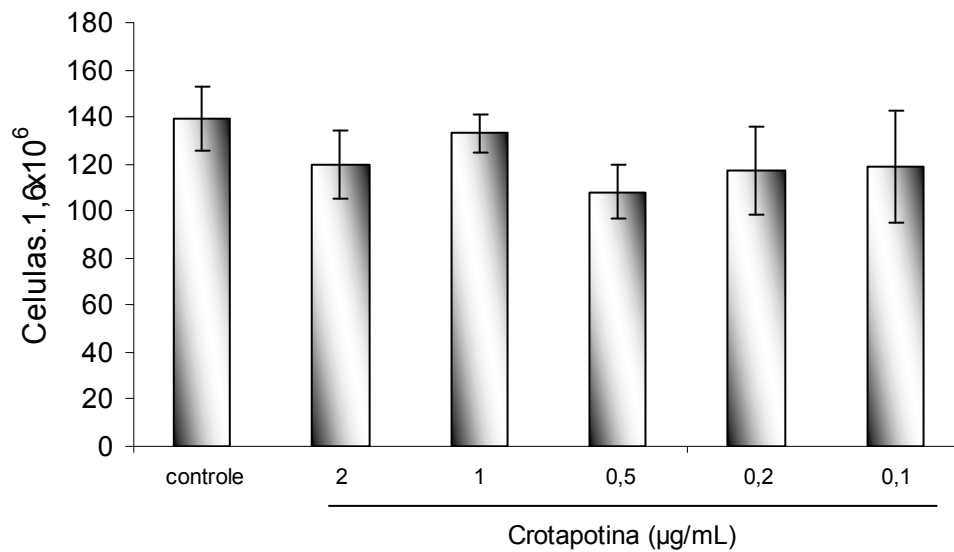


Figura 3: Influência de diferentes concentrações de PLA₂ sobre a proliferação celular através do teste de MTT. Não foi observada redução estatisticamente significativa na proliferação celular nas diferentes concentrações quando comparadas com o grupo controle de PHA. Os dados representam média±EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com n=4.

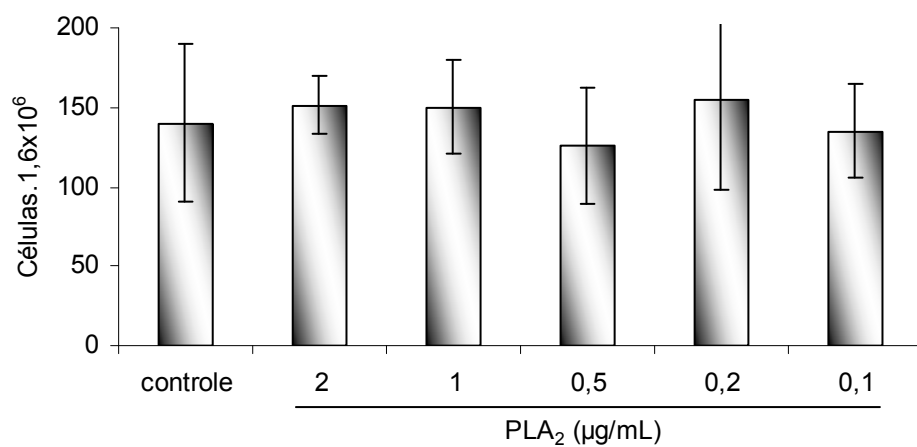


Figura 4: Influência de diferentes concentrações de PLA₂ sobre a citotoxicidade celular pelo teste de exclusão com *tripan blue*. Não foi observada morte celular nas concentrações utilizadas. Os dados representam média±EP e todos os grupos foram realizados em triplicata com n=3.

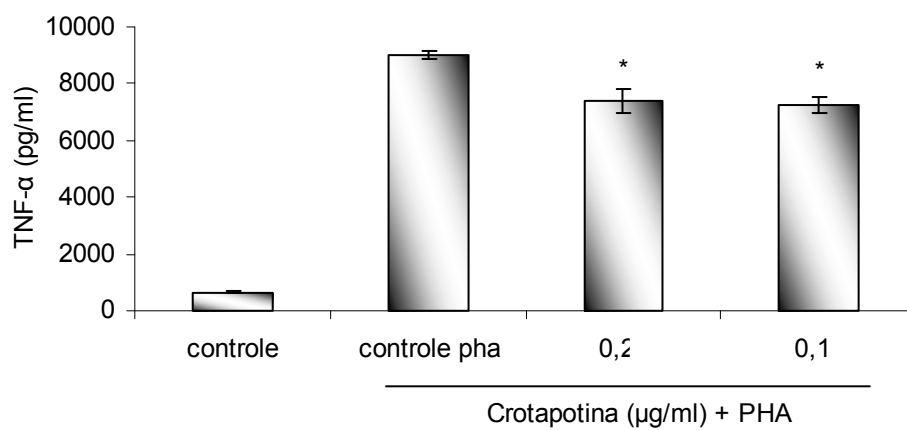


Figura 5: Influência de duas diferentes concentrações de crotapotina na produção de TNF- α pelas células estimuladas com fitohemaglutina. Os * representam uma redução estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle de PHA ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=3$.

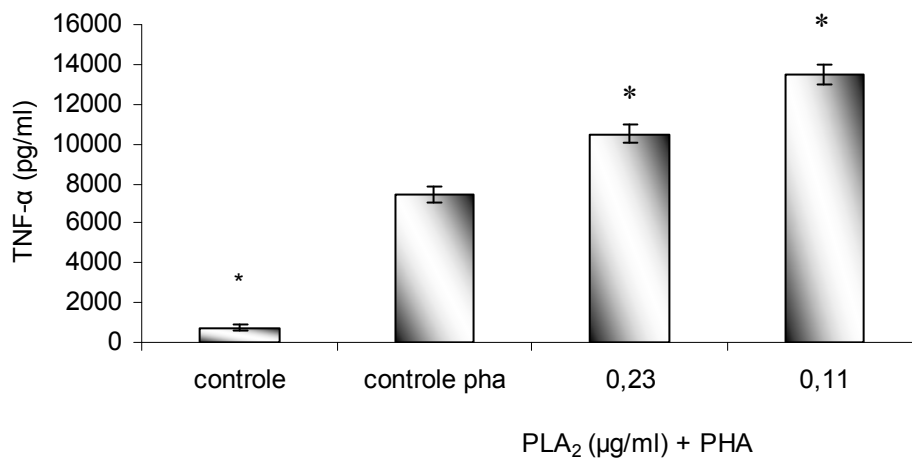


Figura 6: Influência de duas diferentes concentrações de PLA₂ na produção de TNF- α pelas células estimuladas com fitohemaglutina. Os * representam um aumento estatisticamente significativo quando comparados com o grupo controle de PHA ($P < 0,05$). Os dados representam média \pm EP e todos os grupos foram feitos em triplicata com $n=3$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração as alterações fisiológicas causadas pela peçonha de serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus* e a variedade de efeitos causados por suas frações, tentamos com este trabalho ampliar os conhecimentos relacionados às alterações homeostáticas causadas pela peçonha e buscar possíveis mecanismos de ação. Também procuramos entender os efeitos sobre a resposta proliferativa, inflamatória e antiinflamatória das subfrações crotapotina e PLA₂, formadoras da crotoxina do veneno desta serpente.

Tendo em vista estes objetivos, neste trabalho foi possível verificar que:

- O pool de veneno de *Crotalus durissus terrificus* do estado do Rio Grande do Sul apresentou perfil cromatográfico semelhante ao pool de veneno do estado de São Paulo, demonstrando que existe pequenas diferenças nas peçonhas de regiões distintas;
- Os picos que diferenciaram o cromatograma do Rio Grande do Sul do cromatograma de São Paulo, não causaram alterações na atividade agregante plaquetária do veneno.
- A capacidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* do Rio Grande do Sul de agregar plaquetas não se deve aos mecanismos que envolvem inibição de NO ou das E-NTPDases.
- Sugere-se que a PLA₂, subunidade protéica da crotoxina tenha sido a responsável por causar aumento na atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP do veneno de *Crotalus durissus terrificus* demonstrando que este pode ser o mecanismo da ação antiagregante plaquetário desta subfração.
- A crotapotina, uma das subfrações formadora da crotoxina, foi capaz de diminuir a proliferação celular e modular a resposta inflamatória *in vitro*, verificada através da diminuição dos níveis de TNF- α , mas nas doses utilizadas não foi verificada citotoxicidade nas PBMCs.

- A PLA₂ foi capaz de aumentar os níveis expressos de TNF- α pelas PBMCs mas não causou morte celular nem aumento significativo na proliferação celular nas células estimuladas com PHA, nas doses utilizadas.

Por fim, cabe salientar a relevância da execução deste trabalho, já que até então, não existiam estudos que demonstrassem a presença das frações, normalmente descritas para a subespécie, na *Crotalus durissus terrificus* do Rio Grande do Sul, além de ter sido possível verificar alterações cromatográficas e identificar alguns mecanismos de ação da peçonha.

-

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Muitos casos já foram noticiados de acidentes em que pessoas foram picadas por serpentes peçonhentas. Envenenamentos causados por cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) significam 5% das picadas por serpentes no Brasil, e seu efeito é associado a uma resposta sistêmica do organismo e a sintomas neurotóxicos resultando em 6% de mortes por envenenamento das vítimas sem tratamento. Este estudo intitulado **“Determinação da Citotoxicidade Média e da Capacidade Linfoproliferativa das Frações do Veneno de *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: Viperidae) do Rio Grande do Sul sobre Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano”**, tem por objetivo observar o efeito das frações do veneno deste animais sobre células de defesa (linfócitos) do organismo humano. Para isso, será coletado 20mL de sangue por punção venosa dos doadores. Os resultados desta pesquisa trarão avanços acerca do conhecimento da ação tóxica do veneno, e contribuirá para um melhora auxílio às vítimas.

Eu.....,RG:

....., fui informado dos objetivos desta pesquisa. Recebi informações acerca dos procedimentos a serem realizados e minhas dúvidas foram esclarecidas. Sei que meu nome será mantido em sigilo. Poderei obter resultados da pesquisa se julgar necessário, bem como solicitar a exclusão dos meus dados no momento que desejar. Estou ciente de que na punção venosa pode ocorrer desconforto e, eventualmente, um pouco de dor no local. Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito ao tratamento médico, conforme estabelece a lei, sem nenhum tipo de ônus.

Caso houver perguntas sobre o estudo, posso entrar em contato com a mestrandia Carolina Maria Alves Bastos no fone (51) 92691014. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso entrar em contato com o orientador do projeto Prof. Dr. Jarbas R. de Oliveira, pelo telefone (51) 33203500 ramal 4147.

Declaro que recebi cópia do presente TERMO DE CONSENTIMENTO.

Assinatura do paciente Nome Data

Assinatura do pesquisador Data

Este formulário foi lido para _____
_____, em ____ / ____ / ____ por _____, enquanto eu
estava presente.

Assinatura do testemunha Nome Data

ANEXO 2

NORMAS DO PERIÓDICO

NORMAS DO PERIÓDICO

TOXICON

An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms
Official Journal of [The International Society on Toxinology](#)

Guide for Authors

Submission of Papers

It is a condition of publication that all manuscripts must be submitted in English to the *Toxicon* submission and review website, <http://ees.elsevier.com/toxcon/>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers. Should you be unable to provide an electronic version, please contact the editorial office prior to submission at e-mail: authorsupport@elsevier.com. Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. The Editor welcomes submission by the authors of the names and addresses of up to four or five individuals who could expertly review the submitted manuscripts, and who are not from the same institutions as the authors. The Editor, of course, reserves the right to use these or other reviewers of his choice.

Electronic Submission

All manuscripts must be submitted in English to *Toxicon's* submission and review website <http://ees.elsevier.com/toxcon/>.

Language: English is the preferred language, but where submission of a manuscript in English is not possible, French, German or Spanish can be used as long as the paper is accompanied by a 200-300 word English abstract.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. All numbers should be numbered consecutively. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of

uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Paper length: *Toxicon* has set no standard length for papers, but the Editors insist upon a clear presentation of data in as concise a form as is consistent with good reporting. The fragmentation of a report into several short papers is discouraged.

Abstracts: There should be an abstract of no more than 200 words.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (introduction, materials and methods, results and discussions), Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Units: Units of measure must be clearly indicated.

Symbols: The Latin name must be given for all animal and plant species. Trade names or abbreviations of chemicals may be used only when preceded by the chemical or scientific name. Thereafter, trade names, common names or abbreviations should be used.

Mathematical equations: Compound numbers should be in bold face Arabic numerals or underscored.

Acknowledgements: All sources of funding supporting the work are to be declared. Authors are to disclose all financial relationships with any persons or organisations that could be perceived to bias the work described in the manuscript. These acknowledgements should be placed after the text and before the references, under the heading "Acknowledgements". In submitting the article for consideration for publication, the author(s) attest that all potential conflicts of interest have been disclosed and addressed in the manuscript.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that?" or "This is in the agreement with results obtained later (Kramer, 1994)"). For three or more authors use the first author followed by "et al.", in the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Mihelich, E.D., Carlson, D.G., Fox, N., Song, M., Schevitz, R.W., Snyder, D.W., 1997. Structure based design and therapeutic potential of phospholipase A₂ inhibitors. In: Uhl, W., Nevalainen, T.J., Buchler, M.W. (Eds.), *Phospholipase A₂ Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Disease*, Karger, Basel, pp. 140-145.

Possani, L.D., 1984. Structure of scorpion toxins. In: Tu, A.T.T. (Ed.), *Handbook of natural toxins*, vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 513-550.

Smith, L.A., 1998. Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. *Toxicon* 36 (11), 1539-1548.

Illustrations: All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line drawings: Good quality printouts on white paper produced in black ink are required. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable. Photographs must be kept to a minimum.

Colour: Where colour printing is required the author will be charged for colour printing at the current colour printing costs.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into *Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion*. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten

pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

Letters to the Editor: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxinology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxinology. They should be headed 'Letter to the Editor' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of appropriate meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology.

Reviews: Articles of interest to toxinologists which are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinions to the attention of the Review Editor.

Molecular Biology: Papers on molecular biological aspects of toxins are welcome. They can include cloning, expression, genetic and related studies. The papers must add to the understanding of the role or function of toxins. Papers providing cDNA sequences without any relevant conclusions are not acceptable. If cDNA sequences are included, authors must guarantee that the sequences will be deposited in a public gene bank before the publication of the paper in *Toxicon*.

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following guidelines:

1. The title and abstract should include the scientific as well as the local name for the species involved and should provide keywords for indexing systems, including the country where the envenoming or poisoning occurred and the principal or most important observation.
2. A brief description of the responsible organism and, ideally, a photographic record and details of its distinguishing features should be included. The specimen of the animal or plant should, if possible, be deposited in a recognized museum accessible to scientists from all over the world.
3. Clinicians caring for cases of envenoming and poisoning which seem likely to be of interest should save samples of blood, wound swab or aspirate, stomach contents and urine or, in fatal cases, a block tissue from the site of the bite or sting for subsequent immunodiagnosis.
4. Cases of bites by captive species have the advantage that the specimen has often been identified by the owner, but this identification is sometimes incorrect and in many cases, the precise geographical origin is uncertain. Independent verification is helpful. Some attempt should be made to investigate the effect of envenoming or poisoning on haematological,

biochemical and other variables measurable in the laboratory.

5. The clinical description should document the evolution of symptoms, signs and results or investigations with references to time after bite/sting/ingestion.
6. The effect of treatment is of great interest and importance. Details of the manufacturer and specificity of antivenom should be given, and other drugs which may have modified the clinical presentation and natural history of envenoming or poisoning must be mentioned. The most valuable reports of therapeutic interventions and the only ones that can be interpreted with confidence are those designed prospectively as randomized, double-blind, comparative or placebo- controlled trials, in which the numbers of patients chosen for each treatment group are justified by power calculations. In such cases the keywords 'randomized controlled trial' should be included for indexing purposes. Where possible, objective rather than subjective assessments of efficacy should be used.
7. Literature search has now been made easy by CD-ROM and other computerized systems in most countries. The available literature should be reviewed thoroughly so that repetition of previously published observations can be avoided and the new observations can be put in context.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect (☞ <http://www.sciencedirect.com>). In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at ☞ <http://authors.elsevier.com>.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first named author if no corresponding author is identified of multi-authored papers) and should be returned within 48 hours of receipt. Corrections should be restricted to typesetting errors; any others may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since the inclusion of late corrections cannot be guaranteed. Proofs are to be returned by email or fax, or to the Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter,

Devon EX1 2AH, UK.

Offprints

Where the research is supported by a fund which can be used for pages charges, the author is invited to make a voluntary contribution towards publication costs, in which case 100 offprints will be supplied free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, without the author relinquishing his/her proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of a similar nature, and translations. It also includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any material for which copyright already exists.

Author Services

For queries relating to the general submission of manuscripts (including electronic

text and artwork) and the status of accepted manuscripts, please contact Author Services, Log-in Department, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. E-mail: authors@elsevier.co.uk, Fax: +44 (0) 1865 843905, Tel: +44 (0) 1865 843900. Authors can keep a track of the progress of their accepted article on the Internet on our Author Gateway (go to <http://authors.elsevier.com/>) and key in the corresponding author's name and the Elsevier reference number.

Language Polishing: Authors who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our [Terms & Conditions](#).