



## CROTOXINA E CROTOXINA-SIMILE ISOLADAS DE VENENOS DE SUBESPÉCIES DE *Crotalus durissus* E SUAS MÚLTIPLAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS<sup>1</sup>

Maria Cristina Dos-Santos<sup>2</sup>

*Submetido 22/09/2013 – Aceito 20/01/2014 – Publicado on-line 03/04/2014*

### Resumo

No Brasil são encontradas sete subespécies de *Crotalus durissus* (*C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* e *C. d. trigonicus*), popularmente conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, entre outras. As cascavéis são serpentes de porte médio e distribuídas em regiões onde ocorre vegetação relativamente aberta como cerrados, lavrados e campos, e raramente são encontradas na faixa litorânea. A característica mais evidente da cascavel é o chocalho (ou guizo) situado na ponta da cauda, que é vibrado quando a serpente se sente ameaçada. O veneno das cascavéis são misturas complexas de proteínas sendo a Crotoxina ou a Crotoxina-simile o principal componente tóxico. A Crotoxina foi isolada pela primeira vez, em 1938, por Slotta e Fraenkel-Conrat, do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, e as Crotoxinas-similes de outras subespécies de *Crotalus durissus* encontradas no Brasil: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis* e *C. d. ruruima*. A Crotoxina ou Crotoxina-simile são complexos proteicos formados da ligação iônica entre uma proteína ácida, não tóxica, denominada de Crotapotina ou Crotoxina A e outra básica, pouco tóxica, a Fosfolipase A<sub>2</sub> ou Crotoxina B, que apresentam várias isoformas e inúmeras atividades biológicas, as quais serão abordadas neste artigo de revisão.

**Palavras-Chave:** cascavel; subespécies; América do Sul.

### Abstract

In Brazil, we can find seven subspecies of *Crotalus durissus* (*C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* and *C. d. trigonicus*), popularly known as rattlesnake, four-noustril rattlesnake, “boicininga”, “maracambóia”, “maracá”, among others. The rattlesnakes are midsize snakes and are distributed throughout regions where vegetation is relatively open such as savannahs and plowed fields, and are rarely found on the coastal strip. The most obvious feature is the rattle of the rattlesnake located on the tip of its tail, which vibrates when the snake feels threatened. The venoms of rattlesnakes are complex mixtures of proteins with crotoxin or crotoxin-like substance being the primary toxic component. Crotoxin was first isolated in 1938 by Slotta and Fraenkel-Conrat, from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* and Crotoxin-like from other subspecies of *Crotalus durissus* found in Brazil: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis* and *C. d. ruruima*. Crotoxin or Crotoxin-like protein complexes are formed by ionic bonding of an acidic nontoxic protein named Crotoxin A or crotapotin with another basic, low toxicity, Phospholipase A<sub>2</sub> or Crotoxin B which have several isoforms and numerous biological activities, which are presented in this review article.

**Key-words:** rattlesnakes; subspecies; South America.

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa da autora

<sup>2</sup> Professora Associada IV, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, CEP: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: mcsantos@ufam.edu.br.

## 1. Introdução

Os venenos das serpentes, como o da cascavel, são misturas complexas de componentes orgânicos e inorgânicos produzidos e armazenados em glândulas especializadas. Dentre os componentes orgânicos, destacam-se os peptídeos e as proteínas, que podem apresentar ou não atividade enzimática e agir em vários sistemas fisiológicos, levando a morte ou morbidade de suas presas ou vítimas, após serem injetados. Variações dos constituintes químicos e de suas concentrações já foram descritas para os venenos de uma mesma espécie (ontogenética, inter e intrapopulações) e, devido a essas variações, os acidentados podem apresentar diferenças nos sinais e sintomas após a picada, pois a fisiopatologia do envenenamento é resultado do somatório ou do sinergismo das ações biológicas desencadeada por cada constituinte do veneno. Além dessas variações, podem ocorrer, ainda, polimorfismos genéticos que induzem trocas de aminoácidos nas sequências de proteínas, resultando em diferentes conformações, tropismos e, conseqüente, ações biológicas distintas, como será mostrado neste artigo de revisão para a crotoxina e crotoxina-simile, dos venenos de subespécies de *Crotalus durissus*.

## 2. Metodologia

A revisão bibliográfica, para a elaboração do presente artigo foi realizada nos seguintes sítios de busca: *Scopus*, *Scirus*, *MEDLINE*, *Science Direct*, *PubMed*, *PubMed Central* e *Periódicos CAPES*, o período consultado foi de 1938 a 2013 e a palavra-chave “crotoxin” foi associada com as seguintes palavras: “isolation” ou “characterization” ou “biological activities” ou *Crotalus durissus cascavella* ou *Crotalus durissus collilineatus* ou *Crotalus durissus dryinas* ou *Crotalus durissus marajoensis* ou *Crotalus durissus ruruima* ou *Crotalus durissus terrificus* ou *Crotalus durissus trigonicus*.

Nesta revisão serão abordados os estudos realizados com a crotoxina purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e com as crotoxinas-similes, dos venenos das subespécies de *Crotalus durissus*, encontradas no território brasileiro: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis* e *C. d. ruruima*. Não foram

encontradas referências para os venenos de *Crotalus durissus dryinas* e de *Crotalus durissus trigonicus*. Ressalta-se que o termo “crotoxina” será utilizado apenas para o complexo isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

## 3. O Gênero *Crotalus* sp.

O gênero *Crotalus* sp., pertencente a família Viperidae, subfamília Crotalinae, possui cerca de 70 espécies e subespécies (<http://www.reptile-database.org>) é encontrado somente no Novo Mundo, do sul do Canadá à Argentina Central. Embora a maioria das espécies habite as regiões áridas, tais como: cerrados, desertos, lavrados e savanas, algumas espécies podem ser encontradas em regiões pantanosas e de florestas (KLAUBER, 1972; CAMPBELL e LAMAR, 2004). A espécie encontrada no Brasil é a *C. durissus* e possui sete subespécies *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* e *C. d. trigonicus* (CAMPBELL e LAMAR, 1989). No entanto, alguns autores consideram as subespécies *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* sinônimos de *C. d. terrificus* (WÜSTER et al., 2005).

Os acidentes com a maioria das serpentes do gênero *Crotalus* sp. da América do Norte e da América Central, não apresentam sintomas neurotóxicos. Os sintomas e sinais apresentados são tanto locais quanto sistêmicos. Dos locais, os mais frequentes são dor, edema e hemorragia; os sistêmicos incluem alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório e urinário (OWNBY, 1982). Já o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel sul americana mais estudada, apresenta atividade coagulante de pequena intensidade. No local da picada observam-se edema discreto e parestesia persistente, enquanto sistemicamente há sintomas de envolvimento de ações neurológicas e miotóxica como: “fácies miastênica” (ptose palpebral uni ou bilateral e paralisia da musculatura facial), oftalmoplegia, dificuldade de acomodação visual, mioglobinúria e elevação dos níveis séricos da enzima creatina-quinase (CK) (AZEVEDO-MARQUEZ et al., 1985; AZEVEDO-MARQUEZ et al., 1987). As ações miotóxica e neurotóxica, induzidas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus*, são atribuídas ao complexo proteico, alvo desta revisão, a Crotoxina.

#### 4. O veneno de *Crotalus durissus terrificus*

Dos venenos das cascavéis brasileiras o mais estudado quanto a sua composição química e atividade biológica foi o de *Crotalus durissus terrificus*. Deste veneno já foram isoladas e caracterizadas as atividades biológicas de várias proteínas, como descrito a seguir: Crotamina foi a primeira proteína isolada, em 1950, por Moura-Gonçalves e Vieira, de venenos de serpentes brasileiras; a Gioxina foi isolada por Barrio, em 1961; Trombina-simile purificada por Raw e colaboradores, em 1986 - porém, Alexander e colaboradores (1988) observaram que a trombina-simile apresentava massa molecular semelhante e a mesma atividade biológica da Gioxina -; a Convulxina, purificada em 1970, por Prado-Franceschi (PRADO-FRANCESCHI; VITAL-BRAZIL, 1981); a Fosfolipase A<sub>2</sub> "intercro" isolada por Vieira, 2009; e, recentemente, em 2012, foi isolada por Bordon e colaboradores a Hialuronidase.

#### 5. Crotoxina e Crotoxina-simile

A crotoxina, o principal componente tóxico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* isolado em 1938 (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT 1938a, b), foi a primeira proteína de veneno a ser cristalizada (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT 1938a, b). Em 2007, foi recristalizada e cristalografada em raios-X (SANTOS et al., 2007). A crotoxina possui peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons, ponto isoelétrico de 4,7 e representa 65 a 68% do peso total do veneno (HANASHIRO et al., 1978). Uma forte indicação da não homogeneidade dessa proteína foi mostrada, dezoito anos mais tarde, por Fraenkel-Conrat e Singer (1956) que, tratando a crotoxina com fluorodinitrobenzeno, verificaram a presença de duas subunidades: a subunidade maior era básica e rica em resíduos de lisina e arginina, enquanto a subunidade menor era fortemente ácida (AIRD et al., 1985). Todavia, foi só, em 1970, que Habermann e Rübsamen, cromatografando a crotoxina em coluna de carboximetil celulose na presença de tampões ácidos, obtiveram duas frações. Uma fração fortemente básica, pouco tóxica e com atividade fosfolipásica e outra ácida, não tóxica, sem atividade fosfolipásica. Quando as duas frações eram misturadas, a toxicidade in vivo da fração básica era potencializada pela fração ácida, enquanto a atividade enzimática, in vitro, da fosfolipase era inibida. Hendon e Fraenkel-

Conrat, em 1971, separaram os componentes da crotoxina tanto em DEAE-celulose pH 6,0 na presença de 6 mol L<sup>-1</sup> de ureia, como também em carboximetil-celulose, sem ureia. Rübsamen e colaboradores, em 1971, denominaram a proteína ácida de crotapotina - *crota*, por ter sido isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*; *pot*, por potencializar a toxicidade da fosfolipase A<sub>2</sub> in vivo, e *in* por inibir a atividade enzimática in vitro da fosfolipase A<sub>2</sub>. Fraenkel-Conrat e associados preferiram denominar a crotapotina e a fosfolipase A<sub>2</sub> em Crotoxina A e Crotoxina B, respectivamente (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978). Quinze isoformas de crotoxina já foram isoladas e caracterizadas (FAURE et al., 1991; WU et al., 1983).

Crotoxinas-similes já foram isoladas dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e detectada, pela técnica Western-blot, no veneno de *C. d. marajoensis*. A crotoxina-simile obtida do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* constitui 60% do peso seco do veneno, apresenta propriedades semelhantes às da crotoxina incluindo: a estrutura heterodimérica não covalente, mobilidade eletroforética em SDS-PAGE, ponto isoelétrico, toxicidade em camundongos, reatividade imunológica, múltiplas isoformas, atividade fosfolipásica, mapeamento de peptídeos e estabilidade em coluna de troca aniônica (LENNON e KAISER, 1990).

Dos venenos variedade amarela e branca, de *Crotalus durissus ruruima*, foram separadas crotoxinas-similes por precipitação, no ponto isoelétrico de 4,7. Semelhantes a crotoxina, apresentaram no gel de poliácridamida, na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (PAGE-SDS), duas bandas: uma de 14 kDa e outra de 9 kDa correspondentes a fosfolipase A<sub>2</sub> e crotapotina, respectivamente (dados não publicados). Os venenos de *Crotalus durissus ruruima* foram analisados individualmente e foi observado que os da variedade branca apresentaram maiores concentrações de crotoxina-simile do que os da variedade amarela (DOS-SANTOS et al., 2005). A Análise proteômica revelou que 82,7% do veneno da variedade branca de *C. d. ruruima* é composto por crotoxina-simile e, dentre os venenos estudados, foi o que apresentou maior concentração dessa proteína. Por exemplo, o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, desse estudo, apresentou em sua composição proteica total 59,5% de crotoxina (CALVETE et

al, 2010), uma quantidade semelhante àquela observada por Hanashiro e colaboradores (1978), que foi de 65 a 68% do peso total do veneno.

A crotoxina-simile obtida do veneno de *Crotalus durissus cascavella* também apresentou duas bandas na eletroforese em PAGE-SDS-Tricina: uma de 15 kDa que corresponde a fosfolipase A<sub>2</sub> e a outra de 9 kDa referente à crotapotina (BEGHINI, et al., 2000).

O perfil eletroforético, em SDS-PAGE, do veneno de *Crotalus durissus marajoensis* apresentou três bandas características de massas moleculares de aproximadamente 9, 15 e 30 kDa correspondentes a crotapotina, a fosfolipase A<sub>2</sub> e a crotoxina-simile, respectivamente. Porém, as presenças de crotoxina-simile e de fosfolipase A<sub>2</sub>, no veneno de *C.d. marajoensis*, só foram confirmadas com auxílio da técnica de Western blot e pelo uso antifosfolipase A<sub>2</sub> de *C. d. terrificus*, o qual revelou duas bandas: uma de aproximadamente 15 kDa (fosfolipase A<sub>2</sub>) e outra de 30 kDa (crotoxina-simile) (GUIDOLIN et al., 2013).

## **6. Subunidades de Crotoxina e Crotoxinas-similes: Crotapotina (Crotoxina A) e Fosfolipase A<sub>2</sub> (Crotoxina B).**

Em 1974, Breithaupt e colaboradores demonstraram que a crotapotina, o componente ácido da crotoxina, isolada por cromatografia de carboximetil-celulose, apresenta um peso molecular de 8.900 daltons e ponto isoelétrico determinado por focalização isoelétrica de 3,4. A crotapotina é composta por três cadeias peptídicas (A, B e C) unidas por sete pontes de sulfeto. Essas três cadeias foram originadas da clivagem proteolítica de um precursor homólogo à fosfolipase A<sub>2</sub> (BOUCHIER et al., 1991). A cadeia A contém 40 resíduos de aminoácidos ( $M_r$  4.274); a cadeia B, 34 resíduos ( $M_r$  3658), e a cadeia C, 14 resíduos de aminoácidos ( $M_r$  1558), que, em soluções de baixa força iônica, podem ser encontradas como dímero ( $M_r$  12000, 12600).

Aird e colaboradores (1985), utilizando cromatografia líquida em alta eficiência (HPLC), purificaram a crotapotina em coluna de DEAE-ureia e confirmaram os resultados obtidos por Breithaupt et al. (1974) – isto é, a presença de três cadeias peptídicas. A única diferença foi observada na cadeia A que apresentou 38 resíduos (dois resíduos a menos que o observado anteriormente). As três cadeias polipeptídicas da crotapotina foram comparadas com sete diferentes

fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas dos venenos de diferentes espécies de serpentes: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox*, *Trimeresurus oknavensis*, *Bitis caudalis*, *Bitis nasica* e *Bitis gabonica*. A cadeia A apresentou homologia nos resíduos de aminoácidos correspondentes às posições 24-32 e 41-52, comum a todas as fosfolipases usadas na comparação. Na cadeia B, a homologia entre os segmentos das fosfolipases foi também muito grande nas posições 71-104. Os 14 resíduos da cadeia C apresentaram homologia com a posição carboxi-terminal de todas as fosfolipases A<sub>2</sub>, como também, grande homologia com o segmento (resíduo 48-61) de neurofisinas de mamíferos e seus precursores. A homologia existente entre a cadeia C e as neurofisinas sugere que a crotapotina tem como função “acompanhar” a fosfolipase A<sub>2</sub> ao alvo, evitando assim uma ligação inespecífica (JENG et al., 1978; AIRD et al., 1985).

A fosfolipase A<sub>2</sub> o componente básico da crotoxina, tem peso molecular de 14.500 daltons e ponto isoelétrico 9,7. Consiste de uma cadeia peptídica de 123 aminoácidos (FRAENKEL-CONRAT et al., 1980) que formam dobras que se anelam no nível de suas oito pontes dissulfeto (BREITHAUPT et al., 1974). Possui grande similaridade em tamanho, quantidade de resíduos de cisteína e, com respeito à existência de sítio ativo, com as fosfolipase A<sub>2</sub> já estudadas na época (pancreática de porco e  $\beta$ -Bungarotoxina). Esses autores verificaram, ainda, que as fosfolipases usadas na comparação apresentavam uma histidina essencial para a sua atividade enzimática na posição 48 e que se inativava ao reagir com p-brometo de fenacila. Por outro lado, demonstraram que o complexo crotoxina reconstituído pela interação da crotapotina com a fosfolipase A<sub>2</sub> – tratada com p-brometo de fenacila – apresentava perda da atividade mionecrótica e da letalidade. No entanto, essa crotoxina reconstituída mantinha suas características antigênicas, pois era reconhecida por anticorpos produzidos contra o complexo ativo (JENG e FRAENKEL-CONRAT, 1978; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1981).

Aird e colaboradores, em 1986, também sequenciaram a fosfolipase A<sub>2</sub> da crotoxina, fragmentando a proteína com brometo cianogênio e endoprotease específica para arginina e lisina. Alguns resíduos obtidos, dessa fragmentação, diferiram dos resíduos obtidos por Fraenkel-

Conrat e colaboradores (1980). Notaram, ainda, que algumas posições exibiam variação alélica. Em alguns lotes de veneno o aminoácido da posição 33 era ácido glutâmico (GLx), enquanto, em outros, foi encontrado arginina (Arg), nessa posição (AIRD et al., 1986; AIRD et al., 1990).

A sequência de aminoácidos da fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* foi comparada com as sequências de fosfolipases obtidas dos venenos de outras serpentes. A fosfolipase A<sub>2</sub> da crotoxina-simile do veneno de *Crotalus viridis concolor* apresentou 100% de homologia com os 43 resíduos da posição N-terminal da fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*. Quando compararam a fosfolipase A<sub>2</sub> com a crotapotina de *Crotalus durissus terrificus*, a homologia foi de 56,6% (a estimativa foi feita sobre os 76 resíduos, então conhecidos da crotapotina). A fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* apresentou também homologia com as fosfolipases dos venenos de *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox*, *Trimeresurus oknavensis* e *Bitis caudalis* (AIRD et al., 1986).

Semelhante a outras fosfolipases, esta enzima é relativamente resistente a aquecimento (85 °C), a ácidos e a ureia 6 mol L<sup>-1</sup>; entretanto, é inativada em pH com valores próximos a 9. Demonstra alta atividade enzimática entre pH 7,0 e 8,0 e entre 53 a 57 °C; é dependente de cálcio e é inibida pelo quelante EDTA. Ambos os produtos da hidrólise, lisolecitina e ácidos graxos, inibem sua ação enzimática (BREITHAUPT, 1976).

A fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* é relativamente tóxica quando comparada com outras fosfolipases A<sub>2</sub>. Sua DL<sub>50</sub> determinada em camundongos, pela via intravenosa, é cerca de cinco vezes menor (0,540 mg kg<sup>-1</sup>) que a da crotoxina (HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971; RÜBSAMEN et al., 1971).

A fosfolipase A<sub>2</sub> e a crotapotina foram purificadas da crotoxina-simile de *Crotalus durissus cascavella* por dois passos cromatográficos: cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-75 e cromatografia em HPLC de fase reversa (BEGHINI et al 2000; 2004). A cinética da enzima PLA<sub>2</sub> de *C. d. cascavella* mostrou comportamento alostérico, com atividade máxima em pH 8,3, 35-40 °C e presença de Ca<sup>2+</sup>, porém, a atividade enzimática foi inibida por Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>. Crotapotina, assim como a heparina, inibiram a atividade catalítica da enzima atuando como inibidores alostéricos

(BEGHINI et al., 2000). Fonseca e colaboradores (2006), também trabalhando com a crotoxina-simile de *Crotalus durissus cascavella*, isolaram PLA<sub>2</sub> crotapotina - ambas as frações corresponderam a aproximadamente 85% do peso total da crotoxina-simile - e outra fração menor, que exibiu atividade serina protease. Após refração foram obtidas três novas frações. Uma destas, denominada de F202, foi obtida com alto grau de homogeneidade molecular e com massa molecular de 28 kDa. Esta proteína clivou o fibrinogênio e esta ação foi bloqueada pelos inibidores de serina proteases TLCK (N- $\alpha$ -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila); induziu agregação plaquetária, que também foi inibida por TLCK.

Os venenos individuais das serpentes *Crotalus durissus ruruima*, coletadas em uma única fazenda localizada em Boa Vista, Roraima, Brasil, foram submetidos à cromatografia de fase reversa. Os resultados mostraram a presença de componentes com tempos de retenção muito próximos aos observados para as subunidades da crotoxina isolada de *C. d. terrificus* (crotapotina e fosfolipase A<sub>2</sub>). Para os venenos dos indivíduos de número 69 (veneno amarelo) e 82 (veneno branco) foram observados dois picos na região de fosfolipase A<sub>2</sub> sugerindo a presença de isoformas. Para os venenos 68 amarelo, 110 e 173 branco foi observado apenas um único pico nessa região (DOS-SANTOS, et al.; 2005).

Diz-Filho e colaboradores, em 2009, purificaram a crotoxina-simile do veneno branco de *Crotalus durissus ruruima* e a resubmeteram a um novo processo cromatográfico sobre coluna de fase reversa. Nessas condições os autores purificaram duas crotapotinas e duas isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub> denominadas de PLA<sub>2</sub>A e PLA<sub>2</sub>B. A PLA<sub>2</sub>A representou 26% e a PLA<sub>2</sub>B apenas 7% do total de crotoxina-simile.

A crotoxina-simile e suas subunidades apesar de terem sido detectadas no veneno de *Crotalus durissus marajoensis* (GUIDOLIN, et al., 2013), ainda, não foram isoladas e caracterizadas.

## **7. Isoformas de Crotoxina, de Crotoxinas-similes e de suas Subunidades**

Faure e Bon, em 1987, fracionaram amostras individuais de venenos de serpentes ou misturas de venenos de *Crotalus durissus terrificus* em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os perfis cromatográficos

obtidos de amostras individuais do veneno indicaram que cada serpente sintetiza de cinco a dez diferentes isoformas de crotoxina, em proporções relativas variáveis. A comparação dos perfis cromatográficos entre as amostras individuais e a mistura de venenos permitiu a identificação de quinze isoformas. Essas observações sugerem que cada serpente possa apresentar vários genes que codificam várias isoformas de crotoxina.

Breithaupt e colaboradores, em 1975, separando a crotoxina em carboximetil celulose, observaram a presença de duas isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub>, diferentes uma da outra em alguns aminoácidos. Essa diferença estava presente apenas em alguns lotes de veneno de *Crotalus durissus terrificus* e, em outros lotes, apenas uma isoforma foi encontrada. Este resultado foi confirmado por Faure e Bon (1988), quando fracionaram crotoxina em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) usando colunas de troca aniônica (Mono Q) e troca catiônica (Mono S). Por esse método foram obtidas duas isoformas de crotapotina e quatro isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub>. A reassociação *in vitro* das isoformas de crotapotina com as de fosfolipase A<sub>2</sub> permitiu a obtenção de oito crotoxinas. Comparando as propriedades enzimáticas e farmacológicas dessas crotoxinas reconstituídas verificaram que as duas isoformas da crotapotina apresentavam propriedades idênticas. Todavia, as quatro isoformas da fosfolipase A<sub>2</sub> foram divididas em duas classes: a) as que apresentavam menor atividade enzimática e maior potência farmacológica, b) e as com maior atividade enzimática e menor potência farmacológica. As oito crotoxinas, resultantes das associações entre as duas isoformas de crotapotina com as quatro de fosfolipase A<sub>2</sub> apresentaram ligeiras diferenças na potência letal e em suas propriedades farmacológicas e biológicas. As comparações quantitativas das propriedades dessas isoformas de crotoxinas revelaram que a estabilidade do complexo tem importante papel no desencadeamento de suas ações farmacológicas (FAURE e BON, 1988; FAURE et al., 1991, 1993 e 1994).

Quatro isoformas de crotapotina (F2, F3, F4 e F5) e apenas uma PLA<sub>2</sub> (F6) foram obtidas, da crotoxina-símile do veneno de *Crotalus durissus cascavella*, pela análise cromatográfica em HPLC de fase reversa. A composição de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> apresentou grandes

quantidades de resíduos de meia-cisteína e de resíduos carregados positivamente, enquanto as isoformas de crotapotinas F3 e IF4 mostraram maior quantidade de resíduos carregados negativamente (BEGHINI et al., 2000; 2004).

Crotoxina de *Crotalus durissus ruruima* foi purificada, recromatografada, em coluna de fase reversa e, neste processo, foram obtidas duas isoformas de crotapotina e duas de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>A e PLA<sub>2</sub>B). As massas moleculares obtidas das isoformas PLA<sub>2</sub>A e PLA<sub>2</sub>B foram, respectivamente, de 14299,34 e de 14756,45 daltons (DIZ FILHO et al., 2009).

## **8. Atividades Biológicas de Crotoxina, de Crotoxinas-símiles e de suas Subunidades.**

Como mencionado anteriormente várias atividades biológicas já foram descritas para a crotoxina tais como: neurotóxica (VITAL-BRAZIL, 1966), hemolítica *in vitro* (ROSENFELD, 1971), miolítica (GOPALAKRISNAKONE et al., 1984; MEBS; OWNBY, 1990), analgésica (ZHU et al., 2008), antitumoral (RUDD et al., 1994), agregação de plaquetas (LAUDUCCI et al., 1994), antiviral (MULLER et al., 2012), antibacteriana (DIZ FILHO et al., 2009), anti-inflamatória (NUNES et al., 2010) e imunossupressora (DOS-SANTOS et al., 1986; CARDOSO e MOTTA, 1997).

### **8.1. Atividade Neurotóxica**

Vital-Brazil, em 1966, demonstrou que a crotoxina interrompe a transmissão neuromuscular em preparações de músculo anterior ciático-tibialis, de cães e gatos. Observou, além disso, que em hemidiafragma de rato a crotoxina não produz contração, induzindo um decréscimo na resposta à acetilcolina. Isso o levou a sugerir que a crotoxina interfere na transmissão neuromuscular, provavelmente reduzindo a sensibilidade da placa motora à acetilcolina (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; BON et al., 1979).

Jeng e Fraenkel-Conrat, em 1978, observaram que a inativação da atividade enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub> resultou na perda da toxicidade. Chang e Lee, em 1977, observaram que a ação de bloqueio da crotoxina sobre a transmissão neuromuscular foi reduzida quando íons de Ca<sup>2+</sup> foram substituídos por íons de Sr<sup>2+</sup>, um inibidor da atividade fosfolipásica (BON et al., 1979). Esta observação levou Bon e

colaboradores, em 1979, à hipótese de que a fosfolipase  $A_2$  é a responsável por essa ação. Esses autores, trabalhando com preparações pós-sinápticas de eletroplaca de *Electrophorus electricus*, concluíram que tanto a crotoxina como a fosfolipase  $A_2$  bloqueiam a despolarização causada por agonistas colinérgicos. Nessas condições, a crotoxina expressava uma ação dez vezes mais potente que a fosfolipase  $A_2$ . A crotapotina não bloqueia a despolarização, mas aumenta a atividade farmacológica da fosfolipase  $A_2$  quando as duas proteínas são usadas conjuntamente. A crotapotina previne a ligação inespecífica da fosfolipase  $A_2$  para sítios de baixa afinidade. Dessa forma, os autores demonstraram a ação pós-sináptica da crotoxina e da fosfolipase  $A_2$  e, ainda, que essa ação é dez vezes mais potente que a ação pré-sináptica, concluindo que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* atua tanto nas junções pré quanto nas pós-sinápticas (BON et al., 1979).

O veneno e a crotoxina-simile de *Crotalus durissus cascavella* foram testados em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos e biventer cervicis de pintainhos e induziram potente atividade neurotóxica, principalmente em preparação biventer cervicis de pintainho. O estudo miográfico mostrou, também, que a preparação biventer cervicis de pintainho foi mais sensível ao efeito paralisante do veneno *C. d. cascavella* e da crotoxina-simile isolada deste veneno (BEGHINI, 2001). Como mencionado anteriormente, apenas uma isoforma de  $PLA_2$  e quatro isoformas de crotapotina foram isoladas da crotoxina-simile de *C. D. Cascavella*. Essa situação difere da observada para a crotoxina, da qual foram obtidas três ou quatro isoformas de  $PLA_2$ . Como a toxicidade do veneno depende, em grande parte, do conteúdo de crotoxina ou de crotoxina-simile, a presença de diversas isoformas, deste complexo, pode potencializar a neurotoxicidade.

A crotoxina-simile isolada de *Crotalus durissus cascavella* é, também, uma neurotoxina com ações pré e pós-sináptica e induz potente atividade neurotóxica em baixas doses (BEGHINI et al., 2000; BEGHINI et al., 2004).

O efeito letal da crotoxina tem sido atribuído ao bloqueio pré-sináptico da transmissão neuromuscular, devido à redução da liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas (VITAL-BRAZIL e EXCELL, 1971; CHANG e LEE, 1977). As crotoxinas-similes de *C. D.*

*Collilineatus* e de *C. D. Cascavella* apresentaram alta atividade letal ( $DL_{50}$ ) e foram similares à da crotoxina de *C. D. Terrificus*, com valores de  $DL_{50}$  de 55, 67,5 e 70,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (RANGEL-SANTOS et al., 2004a).

## 8.2. Atividade Miotóxica

Gopalakrishnakone e colaboradores, em 1984, demonstraram, por meio de estudos histopatológicos, que tanto a fosfolipase  $A_2$  como a crotoxina apresentavam atividade mionecrótica quando doses subletais foram injetadas em camundongos pela via intramuscular. O mesmo foi observado, mas em menor intensidade, quando injetaram, nas mesmas condições, o complexo crotoxina reconstituído com a fosfolipase  $A_2$  modificada pelo *p*-brometo de fenacila. Esses autores notaram, também, 72 horas após a injeção da enzima, a presença de mioblastos – indicadores de regeneração muscular – fenômeno que se completava entre o 7<sup>o</sup> e o 11<sup>o</sup> dia. Resultados similares foram obtidos por Kouyoumdjian e colaboradores, em 1986, utilizando ratos como modelo experimental. Gopalakrishnakone e Hawgood, em 1984, também estudaram as alterações morfológicas que ocorrem nos nervos e nas junções neuromusculares de camundongos, induzidas pela injeção de crotoxina. Quando injetaram doses letais de crotoxina pela via intravenosa observaram: alterações nas terminações nervosas do diafragma, incluindo redução na população de vesículas sinápticas; alterações morfológicas no axolema e aumento de tamanho das mitocôndrias, que estavam associados com sinais clínicos e desenvolvimento da paralisia muscular durante a intoxicação sistêmica. Não observaram alterações pós-sinápticas ou miofibrilares no estágio de parada respiratória. Quando a crotoxina foi injetada pela via intramuscular, em doses subletais, os autores observaram, no início da mionecrose, a desorganização da placa terminal, o envolvimento das terminações axônicas pelas células de Schwann e as alterações estruturais axoplasmáticas do nervo pré-terminal.

Salvini e colaboradores, em 2001, demonstraram, in vivo, que a crotoxina induz injúria sistêmica e seletiva em músculos esqueléticos ou regiões musculares compostas por fibras musculares oxidativas dos tipos I e II. Os experimentos comprovaram que a crotoxina é o

componente responsável pela ação de miotoxicidade sistêmica, observada nos acidentes causados por *Crotalus durissus terrificus* (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; 1987).

As crotoxinas-similes, isoladas dos venenos variedade amarela e branca de *Crotalus durissus ruruima*, induziram mionecrose, necrose coagulativa, homogenização e acidofilia citoplasmática, perda das estriações transversais, miólise, edema intersticial, congestão e infiltrado leucocitário de polimorfonucleares neutrófilos, 24 horas após a injeção, por via intramuscular, em camundongos (dados não publicados).

A atividade miotóxica da crotoxina-simile, isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella*, não foi a ação preponderante desse complexo (BEGHINI et al., 2004).

Rangel-Santos e colaboradores (2004a) compararam os efeitos miotóxicos, pela liberação da enzima creatina quinase (CK), induzidos pelas crotoxinas-símiles de *Crotalus durissus cascavella* e de *C. d. collilineatus*, com a crotoxina de *C. d. terrificus*. Os autores constataram que a crotoxina induziu maior aumento dos níveis séricos de CK do que as crotoxinas-similes e, portanto, apresentou maior atividade miotóxica. Neste estudo, ainda, os autores compararam os efeitos miotóxicos induzidos pelas três fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas dos complexos obtidos dos três venenos e constaram que os níveis de CK séricos liberados, após a injeção dessas enzimas, foram similares para as três PLA<sub>2</sub>. Porém, a atividade miotóxica foi menos potente do que a desencadeada pelos complexos íntegros, mostrando a importância da crotopotina (Crotoxina A) para a eficácia dessa ação.

A crotoxina-simile e a fosfolipase A<sub>2</sub>, isoladas do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*, após administração por via intramuscular ou intravenosa, induziram prolongado aumento de creatina quinase (CK) no plasma. Tanto a crotoxina como a PLA<sub>2</sub> induziram miotoxicidade sistêmica, embora a PLA<sub>2</sub> apresentou atividade menos potente do que a crotoxina (GUTIÉRREZ et al., 2008), confirmando assim o observado por Rangel-Santos et al., 2004a.

A fosfolipase A<sub>2</sub> (crotoxina B) interage mais seletivamente com alvos na membrana de células musculares. Essa seletividade pode ser devida a capacidade da crotoxina e da PLA<sub>2</sub> em

induzir miotoxicidade sistêmica. A PLA<sub>2</sub> do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é um exemplo de fosfolipase A<sub>2</sub> de Classe II, que induz miotoxicidade local e sistêmica. A PLA<sub>2</sub> sistêmica tem alta seletividade pelas fibras musculares esqueléticas e não desviam o seu foco, para se ligarem a outros tipos celulares. O que não ocorre com PLA<sub>2</sub> de ação local que se liga a diversos tipos de células. A especificidade das PLA<sub>2</sub> de ação sistêmica permite a difusão desta enzima, além do sítio da injeção, facilitando sua chegada, por meio da corrente sanguínea, a músculos distante causando a rabdomiólise (GUTIÉRREZ et al., 2008).

### **8.3. Atividade analgésica**

Crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* apresentou efeito analgésico que foi total ou parcialmente induzido, em ratos e camundongos, pelo sistema serotoninérgico central, mas não pelos sistemas opioidérgico e colinérgico. A crotoxina, similar a morfina, provocou uma inibição significativa da dor evocada pela descarga de neurônios no núcleo parafascicular talâmico. Esse efeito foi dose-dependente (ZHU et al., 2008).

### **8.4. Atividade agregadora de plaquetas**

A crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* induziu agregação de plaquetas humanas lavadas e os autores demonstraram que este fenômeno é independente de metabólitos pró-agregatórios formados do ácido araquidônico (LAUDUCCI et al., 1994).

Fonseca e colaboradores, em 2006, demonstraram que a agregação plaquetária, observada pela ação da crotoxina-simile, isolada de *Crotalus durissus cascavella*, era na realidade causada por uma serina protease denominada F202, de 28 kDa, presente nesse complexo proteico.

### **8.5. Atividade anti-inflamatória**

Nunes e colaboradores (2010) demonstraram que a crotoxina é responsável por inibir, durante longo período, os efeitos inflamatórios induzidos pela carragenina como: edema, migração de células para local principalmente de polimorfonucleares (PMN) e a interação dos leucócitos com as células endoteliais. A crotoxina induz aumento da fase de rolamento de leucócitos no endotélio, porém inibe o extravasamento dessas células para o local da inflamação. Os autores mostraram que a ação anti-



inflamatória da crotoxina depende da ativação de receptores FPR2/ ALX e FPR1 (do inglês *formyl peptide receptors*).

### **8.6. Atividade antiviral**

A crotoxina, a fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da crotoxina e a fosfolipase A<sub>2</sub> “intercro”, todas obtidas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, apresentaram atividade antiviral frente aos vírus Dengue e Febre amarela, pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e de grande importância na Saúde Pública. A crotoxina e as fosfolipases A<sub>2</sub> inibiram o crescimento dos vírus, em células VERO E6, na fase inicial do ciclo de replicação (MULLER, et al., 2012).

### **8.7. Atividade antibacteriana**

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) isolada da crotoxina-simile de *Crotalus durissus ruruima* apresentou potente atividade antibacteriana frente à bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axopodis PV passiflorae*. Essa atividade antibacteriana não foi inibida pela adição do EDTA (quelante de íons, neste caso Ca<sup>2+</sup>) demonstrando que sítio enzimático, da fosfolipase A<sub>2</sub>, não foi o responsável por esta ação (DIZ FILHO et al., 2009).

### **8.8. Atividade antitumoral**

A crotoxina apresentou atividade citotóxica contra células tumorais murinas, in vitro (CORIN et al., 1993). Rudd e colaboradores, em 1994, demonstraram a ação antitumoral da crotoxina sobre células humanas em cultura. As linhagens celulares Hs 578T (carcinoma de ductos mamários) e SK-LU-1 (adenocarcinoma de pulmão) foram mais sensíveis à ação da crotoxina do que a linhagem U-87 MG (glioblastoma).

Yan e colaboradores, em 2006, investigaram o envolvimento dos processos de autofagia e apoptose, em linhagem de célula K562 de leucemia mieloide crônica, na morte induzida por crotoxina. Os autores demonstraram que ambos, autofagia e apoptose, são ativados durante a morte das células K562 induzida pela crotoxina.

### **8.9. Atividade Imunossupressora**

Rolim-Rosa e colaboradores (1980/81) observaram que as concentrações e os títulos de imunoglobulinas do soro anticrotálico, produzido contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, eram inferiores aos contidos em antivenenos produzidos com venenos de espécies do gênero

*Bothrops* sp. Mais tarde, foi demonstrado que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* suprime, também, a resposta imunológica para outros antígenos (DOS-SANTOS et al., 1986). Esses resultados foram confirmados por Cardoso e Motta, em 1997, que observaram a supressão das respostas imunes humorais, mas não das respostas imunes celulares, para antígenos solúveis, induzidas pelo veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e pela crotoxina. Rangel-Santos e colaboradores (2004b) demonstraram que crotoxina inibiu a liberação das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10, em camundongos imunizados com Albumina de Soro Humano (HSA), porém não a síntese de INF- $\gamma$ . A presença de INF- $\gamma$  demonstra que a resposta imune celular (Th1) foi mantida, enquanto, a humoral, foi inibida (Th2) devida ausência, principalmente, de IL-4.

Em 2001, Cardoso e colaboradores sugeriram que a imunossupressão e a ausência de reação inflamatória local, observadas em camundongos injetados com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, podem ser causadas por ação indireta da crotoxina. Este complexo deve induzir a ativação de mecanismos endógenos, que levam a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e de glicocorticóides, como também, a redução de linfócitos e de células mononucleares circulantes. Outro trabalho no qual foram utilizados ratos (Wistar), que receberam crotoxina ou fosfolipase A<sub>2</sub> por via subcutânea, apresentaram entre uma e duas horas após as injeções: diminuição no número de linfócitos circulantes no sangue e na linfa e aumento dos números de linfócitos B e T, nos nódulos linfáticos mesentéricos. Quando crotapotina foi injetada isoladamente essas atividades não foram observadas, o que demonstra ser a fosfolipase A<sub>2</sub> a porção do complexo responsável por tais efeitos. Os autores demonstraram, ainda, que a crotoxina promove o aumento das moléculas de adesão nos linfócitos (LFA-1) envolvidas no rolamento e na aderência dessas células às células endoteliais da microcirculação sanguínea e às HEV, nos nódulos linfáticos, levando a diminuição do número de linfócitos circulantes. O aumento na expressão das moléculas de adesão, nos linfócitos, pode ser resultado da ação de derivados eicosanóides da via lipoxigenase (ZAMBELLI et al., 2008). Esses achados corroboram com os resultados obtidos por Sampaio e colaboradores (2006) os quais demonstraram que inibição nas atividades de espraiamento e fagocitose dos macrófagos, após



tratamento com a crotoxina ou com a fosfolipase A<sub>2</sub>, foi mediada pelos derivados eicosanoides da via lipoxigenase.

Ao contrário da crotoxina, a fosfolipase A<sub>2</sub> não foi capaz de inibir a proliferação de células esplênicas induzidas pelo mitógeno, Concanavalina A, indicando que a fosfolipase A<sub>2</sub> não é o componente imunossupressor do complexo (RANGEL-SANTOS et al., 2004b). Porém, Sampaio e colaboradores (2005) demonstraram que a fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, inibiu o espriamento e a atividade fagocítica de macrófagos, da cavidade peritoneal de ratos.

A fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da crotoxina, quando usada na imunização de camundongos e equíneos, induziu a produção de anticorpos e a proteção dos animais hiperimunes contra a ação letal do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (DOS-SANTOS et al., 1988; DOS-SANTOS et al., 1989).

## 9. Conclusões

A multiplicidade e diversidade de isoformas podem explicar os tropismos distintos da crotoxina ou das crotoxinas-similes para os diferentes órgãos, tecidos ou células, induzindo diversas atividades biológicas ou atividades semelhantes, com variações em suas intensidades. A utilização de vários genes para codificar um único complexo proteico demonstra a importância da crotoxina ou das crotoxinas-similes para a sobrevivência das subespécies de *Crotalus durissus*.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade (No. 302615/2010-5) à autora. À Valéria Mourão de Moura pela cuidadosa revisão no texto final.

## Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. A autora e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

## Referências

AIRD, S.D., KAISER, I.I., LEWIS, R.V., KRUGGEL, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Archs of Biochem. Biophys.*, 249: 296-300, 1986.

AIRD, S.D., KAISER, I.I., LEWIS, R.V., KRUGGEL, W.G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, 24: 7054-7058, 1985, DOI:10.1021/bi00346a005.

AIRD, S.D., YATES III, J.R., MARTINO, P.A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., KAISER, I.I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of Crotoxin. *Biochim. Biophys Acta*, 1040: 217-224, 1990.

ALEXANDER, G., GROTHUSEN, J., ZEPEDA, H., SCHWARTZMAN, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, 26: 953-960, 1988, doi.org/10.1016/0041-0101(88)90260-7.

AZEVEDO-MARQUES, M. M., CUPO, P., COIMBRA, T.M., HERING, S.E., ROSSI, M.A., LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 23: 631-636, 1985, DOI:10.1016/0041-0101(85)90367-8.

AZEVEDO-MARQUES, M. M., HERING, S.E., CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnakes) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, 25: 1163-1168, 1987, DOI:10.1016/0041-0101(87)90134-6.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta. Physiol. Latino-Am.*, 11: 224-232, 1961.

BEGHINI, D.G. Isolamento e Purificação de uma Neurotoxina Crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: Caracterização Bioquímica e Biológica, Unicamp, Campinas, 2001.

BEGHINI, D.G., RODRIGUES-SIMIONI, L., TOYAMA, M.H., NOVELLO J.C., CRUZ-HÖFLING M. A., MARANGONI, S. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon*, 43: 255-261, 2004. doi:10.1016/j.toxicon.2003.12.001

BEGHINI, D.G., TOYAMA, M.H., HYSLOP, S., SODEK, L.C., NOVELLO J.C., MARANGONI, S. Enzymatic Characterization of a Novel Phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* Rattlesnake (Maracambóia) Venom.



Journal of Protein Chemistry, 19: 679-684, 2000, DOI 10.1023/A:1007152303179.

BON, C. CHANGEUX, J.P., JENG, T.W., FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem*, 99: 471-482, 1979. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13278.x.

BORDON, K.C.F., PERINO, M.G., GIGLIO, J. R., ARANTES, E.C. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie*, 94: 2740-2748, 2012. doi.org/10.1016/j.biochi.2012.08.014.

Bouchier, C., Boulain, J-C., Bon, C., Ménez, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088: 401-408, 1991.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characterization of *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub> and the crotoxin complex. *Toxicon*, 14: 221-233, 1976, doi.org/10.1016/0041-0101(76)90010-6.

BREITHAUPT, H., OMORI-SATOH, T., LANG, J. Isolation and characterization of three phospholipase A from crotoxin complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 403: 355-369, 1975. doi.org/10.1016/0005-2744(75)90065-0

BREITHAUPT, H., RÜBSAMEN, K., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex biochemical analysis of crotopotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. *Eur. J. Biochem*, 49: 333-345 1974. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03838.x

CALVETE, J.J., SANZ, L., CID, P., LA TORRE, P., FLORES-DÍAZ, M., DOS-SANTOS, M.C., BORGES, A., BREMO, A., ANGULO, Y., LOMONTE, B., ALAPE-GIRÓN, A., GUTIÉRREZ, J.M. Snake venomomics of the Central American rattlesnakes *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, 9: 528-544, 2010, doi: 10.1021/pr9008749.

CAMPBELL JA, LAMAR WW. Rattlesnakes. In: Campbell JA, Lamar WW, editors. The Venomous Reptiles of Latin America. Ithaca: Comstock, 1989:330-373.

CAMPBELL, J. A., LAMAR, W.W. The venomous reptiles of the Western Hemisphere, Ithaca, New York, USA. **Comstock Publishing Associates, Ithaca and London**, 2004.

CARDOSO, D. F. MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, 35: 607-612, 1997, doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00134-1

CARDOSO, D. F., LOPES-FERREIRA, M., FAQUIM-MAURO, E. L., MACEDO, M. S., FARSKY, S. H. P. Role of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of Inflammation*, 10: 125-133, 2001.

CHANG, C.C., LEE, J.D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting simile β-Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 296: 159-168, 1977.

CORIN, R.E., VISKATIS, L.J., VIDAL., J.C., ETCHEVERRY, M.A. Cytotoxicity of CrTX on murine erythroleukemia cells *in vitro*. *Invest. New Drugs* 11: 11-15, 1993. Doi: 10.1007/BF00873905

DIZ-FILHO, E.B.S., MARANGONI, S., TOYAMA, D.O., FAGUNDES, F.H.R., OLIVEIRA, S.C.B., FONSECA, F.V., CALGAROTTO, A.K., JOAZEIRO, P.P., TOYAMA, M.H. Enzymatic and structural characterization of new PLA<sub>2</sub> isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon*, 53: 104-114, 2009, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.10.021.

DOS-SANTOS, M. C., D'IMPÉRIO-LIMA, R., DIAS DA SILVA, W. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. *Braz. J. Med. Res.*, 19: 636, 1986.

DOS-SANTOS, M. C., DINIZ, C. R., WHITAKER PACHECO, M. A., DIAS DA SILVA, W. Phospholipase A<sub>2</sub> injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 26: 207-213, 1988. doi.org/10.1016/0041-0101(88)90173-0.

DOS-SANTOS, M. C., YAMAGUCHI, I. K., CARICATTI, C. P., HIGASHI, H. G., DIAS-DASILVA, W. Immunization of equines with phospholipase A2 protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Impresso)*, 22: 509-512, 1989

DOS-SANTOS, M.C., BORGES DE ASSIS, E., MOREIRA, T.D., PINHEIRO, J., FORTES-DIAS, C.



L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. **Toxicon**, 46: 958-961, 2005, doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.008

FAURE, G. BON, C. Crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoformas and comparison of their molecular structure and their biological activities. **Biochemistry**, 27: 730-738, 1988, DOI: 10.1021/bi00402a036.

FAURE, G. BON, C. Several isoformas of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 25: 229-234, 1987, doi.org/10.1016/0041-0101(87)90246-7.

FAURE, G., CHOUMET, V., BOUCHIER, C., CAMOIN, L., GUILLAUME, J. L., MOREGIER, B., VUILTHORGNE, M., BON, C. The origin of diversity of crotoxin isoformas in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, 223 (1): 161-164, 1994, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18978.x.

FAURE, G., GUILLAUME, J.L., CAMOIN, L., SALIOU, B., BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, 30: 8074-8083, 1991, DOI: 10.1021/bi00246a028.

FAURE, G., HARVEY, A.L., THOMSON, E., SALIOU, B., RADVANYI, F., BON, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **Eur. J. Biochem.** 214: 491-496, 1993, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17946.x.

FONSECA, F.V., ANTUNES, E., MORGANTI, R.P., MONTEIRO, H.S., MARTINS, A.M., TOYAMA, D. O., MARANGONI, S., TOYAMA, M.H. Characterization of new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. **The Protein Journal**, 25: 183-192, 2006, DOI:10.1007/s10930-006-9001-z.

FRAENKEL-CONRAT, H., JENG, T.W., HSIANG, M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: **Natural Toxins** pp 561 (Eaker, Wadstrom Eds). Pergamon, Oxford, 1980.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archs. Biochem.**, 60: 64-73, 1956, doi.org/10.1016/0003-9861(56)90397-6.

GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D.W., HAWGOOD, B.J., ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. **Toxicon**, 22: 85-98, 1984, doi.org/10.1016/0041-0101(84)90141-7.

GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, 22: 791-804, 1984, DOI:10.1016/0041-0101(84)90162-4.

GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J., THEAKSTON, R.D.G. Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. **Toxicon**, 19: 131-139, 1981, doi.org/10.1016/0041-0101(81)90125-2.

GUIDOLIN, F.R., TAMBOURGI, D.V., GUIDOLIN, R., MARCELINO, J.R., OKAMOTO, C.K., MAGNOLI, F.C., QUEIROZ, G.P., DIAS-DA-SILVA, W. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, 66: 7-17, 2013, doi:10.1016/j.toxicon.2013.01.015.

GUTIÉRREZ, J.M., PONCE-SOTO, L., MARANGONI, S., LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity by snake venom group II phospholipase A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, 51: 80-92, 2008, doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.007.

HABERMANN, E., BREITHAUP, H. Mini-review the crotoxin complex – an example of biochemical and pharmacological protein complementation, **Toxicon**, 16: 19-30, 1978. DOI: 10.1016/0041-0101(78)90056-9.

HABERMANN, E., RÜBSAMEN, K. Biochemical and pharmacological analysis of the so-called crotoxin. In *Toxins of Animals and Plant Origin*, Proc of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Animal and Plant Toxins, Tel Aviv, 1970, V.1 p.333.

HANASHIRO, M.A., DA SILVA, M.H., BIER, O.G. Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub>. **Immunochemistry**, 15: 745-750, 1978, doi.org/10.1016/0161-5890(78)90103-7.

HENDON, R. A., FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA**, 68: 1560-1563, 1971.

<http://www.reptile-database.org> consultado em 25 de outubro de 2013.



- JENG, T.W., FRAENKEL-CONRAT, H. Chemical modification of histidine and lysine residues of crotoxin. *FEBS Letters*, 87: 291-296, 1978, doi.org/10.1016/0014-5793(78)80354-8.
- JENG, T.W., HENDON, R.A., FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 600-604, 1978.
- KLAUBER, L. M. Rattlesnakes. Their habits, life histories, and influence on mankind. 2<sup>a</sup>ED., Los Angeles, *University of California Press*, v.1, 1972.
- KOUYOUMDJIAN, J. A., HARRIS, J.B., JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by sub-units of crotoxin. *Toxicon*, 24: 575-583, 1986, doi.org/10.1016/0041-0101(86)90178-9.
- 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. Crotoxin induced aggregation of human washed platelets. *Toxicon* 32, 217-226, 1994, doi.org/10.1016/0041-0101(94)90111-2
- LENNON, B. W. & KAISER, I. I. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97B: 695-699. 1990, doi.org/10.1016/0305-0491(90)90109-7.
- MEBS, D., OWNBY, C.L. Myotoxic components of venom: their biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.*, 48: 223-236, 1990, doi.org/10.1016/0163-7258(90)90081-C.
- MOURA-GONÇALVES, J., VIEIRA, A. Estudos sobre os venenos de serpentes brasileiras – I Análise eletroforética. *An. Acad. Bras. Ciênc*, 22: 141-150, 1950.
- MULLER, V.D.M., RUSSO, R.R., CINTRA, A.C.O., SARTIM, M.A., ALVES-PAIVA, R.M., FIGUEIREDO, L.T.M., SAMPAIO, S.V., AQUINO, V.H. Crotoxin and fosfolipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon*, 59: 507-515, 2012, doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.021.
- NUNES, F.P.B., ZYCHAR, B.C., DELLA-CASA, M.S., SAMPAIO, S.C., GONÇALVES, L.R.C., CIRILLO, M.C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*, 55: 1100-1106, 2010, doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.011.
- OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation *In: Rattlesnake venoms their actions and treatment*, Ed. A.T. TU, New York, Marcel Dekker, p. 163-209, 1982.
- PRADO-FRANCHESCHI, J. Estudo sobre a convulxina. Campinas, 1970. (tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil).
- PRADO-FRANCHESCHI, J., VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 19 875-887, 1981, doi.org/10.1016/0041-0101(81)90085-4.
- RANGEL-SANTOS, A., DOS-SANTOS, E.C., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C., CARDOSO D. F., MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilinetus*. *Toxicon*, 43, 801-810, 2004a, doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.011.
- RANGEL-SANTOS, A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., CARDOSO D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 44: 609-616, 2004b, doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.004.
- RAW, I., ROCHA, M.C., ESTEVES, M.I., KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 19: 333-338, 1986.
- ROLIM-ROSA, R., VIEIRA, E. G. J., SILLES-VILLARROEL, M., SIRACUSA, Y. Q., IIZUKA, H. Análise comparativa entre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957 – 1979). *Mem. Inst. Butantan*, 44-45: 259-270, 1980/81.
- ROSENFELD, G. *IN*: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E. (Eds.), *Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites in South America, Venomous Animals and Their Venoms*, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 362-395, 1971.
- RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 270: 274-288, 1971.
- RUDD, C.L., VISKATIS, L.J., VIDAL, J.C., ETCHEVERRY, M.A. In vitro comparison of



cytotoxic effects of crotoxin in three human tumor cell lines and a normal human keratinocyte cell line. *Invest New Drugs* 12: 183-184, 1994, DOI 10.1007/BF00873958.

SALVINI, T. F., AMARAL, A. C., MYIABARA, E. H., TURRI, J. A. O., DANELLA, P.M., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, 39: 1141-1149, 2001, doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00245-2.

SAMPAIO, S. C., ALBA-LOUREIRO, T.C., BRIGATTE, P., LANDGAF, R.G., DOS SANTOS, E. C., CURI, R., CURY, Y. Lipoxigenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*, 47, 313-321, 2006, doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.008.

SAMPAIO, S. C., RANGEL-SANTOS, A. C., PERES, C. M., CURI, R., CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon*, 45: 671-676, 2005, doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.009.

SANTOS, K.F., MURAKAMI, M.T., CINTRA, A.C., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., FORRER, V.P., BRANDÃO, N. JR., POLIKARPOV, I., ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotopotin and phospholipase A<sub>2</sub>. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63: 287-290, 2007, doi:10.1107/S1744309107006719.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, 12: 505-513, 1938a.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Schlangengifte-III. Mitteilung: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. *Ber. Dtsch. Ges.*, 71: 1076-1081, 1938b.

VIEIRA, L.F. Functional and structural characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> not complexed, intercrop, isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Dissertação de

Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 87 pag, 2009.

VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 981-992, 1966.

VITAL-BRAZIL, O., EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol., London*, 212: 34P-35P, 1971.

WU, S.H., CHANG, F.H., TZENG, M.C. Separation of the subunits of crotoxin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 30: 375-377, 1983, DOI:10.1016/S0021-9673(01)88024-9.

WÜSTER, W., FERGUSON, J.E., QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A., POOK, C.E., SALOMÃO, M.G., THORPE, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol Ecol.* 14:1095-1108, 2005. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x

YAN, C.H., LIANG, Z.Q., GU, Z.L., YANG, Y. P., REID, P., QIN, Z.H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicon*, 47: 521-530, 2006 doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.010

ZAMBELLI, V. O., SAMPAIO, S. C., SUDO-HAYASHI, L. S., GRECO, K., BRITTO, L.R.G., ALVES, A.S., ZYCHAR, B.C., GONÇALVES, L.R.C., SPADACCI-MORENA, D.D., OTTON, R., DELLA-CASA, M.S., CURI, R., CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxigenase-derived mediators. *Toxicon*, 51: 1357-136, 2008 doi: 10.1016/j.toxicon.2008.03.004.

ZHU, Q., WU, D.C., ZHOU, X.P., GONG, S., CHENG, B.C., QIN, Z.H., REID, P.F., YIN, Q.Z., JIANG, X.H. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. *Toxicon*, 51: 102-111, 2008, doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.009.