

2002.05/29



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Daniela Gois Beghini

Isolamento e Purificação de uma Neurotoxina Crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: Caracterização Bioquímica e Biológica

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Daniela Gois Beghini e aprovada pela Comissão Julgadora.

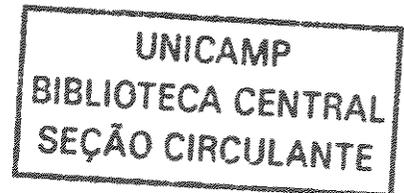
Sérgio Marangoni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular - Área de Bioquímica

Orientador: Prof. Dr Sérgio Marangoni

CAMPINAS - SP

2001



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	I/UNICAMP		
	B 394i		
V.	Ex.		
TOMBO BC	47332		
PROC.	837/02		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00		
DATA	01-02-02		
N.º CPD			

CM00162851-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Beghini, Daniela Gois

B394i Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica/Daniela Gois Beghini. – Campinas, SP:[s.n.], 2001

Orientador: Sérgio Marangoni

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

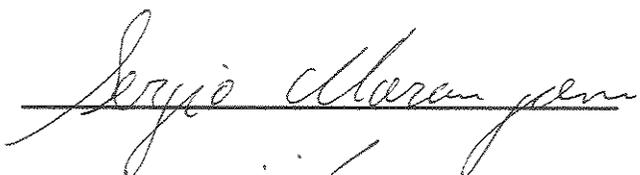
1. Crotoxina. 2. Fosfolipase A₂. 3. Cromatografia. 4. Junção neuromuscular. I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 30 de Outubro de 2001

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sergio Marangoni

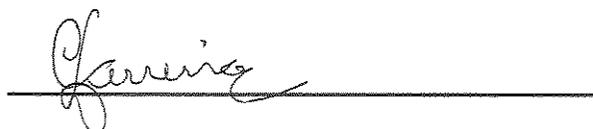
Orientador

Handwritten signature of Sergio Marangoni in cursive script, written above a horizontal line.

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Handwritten signature of Léa Rodrigues Simioni in cursive script, written above a horizontal line.

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Handwritten signature of Carmen Veríssima Ferreira in cursive script, written above a horizontal line.

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

A horizontal line provided for the signature of Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, which is currently blank.

*À minha filha Letícia, ao meu marido Roberto
e aos meus pais*

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, do Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica pela amizade, incentivo e orientação através do caminho da liberdade e responsabilidade.

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama, pela amizade, pelo estímulo e co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop do Departamento de Farmacologia, pela amizade, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni do Departamento de Farmacologia, pela acolhida em seu laboratório, pela amizade, pelo apoio e valiosas sugestões na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pela análise de aminoácidos.

Ao Prof. Dr Hiroshi Aoyama pelas sugestões na realização deste trabalho.

À Saraguacy Hernandez pela amizade e colaboração nos experimentos em nervo frênico-diafragma de camundongo.

À doutoranda Silvana Cristina Pando pela amizade e valiosas sugestões .

Ao Paulo Baldasso pela competência e imprescindível apoio técnico.

Ao biólogo Gildo B. Leite pela amizade e imprescindível apoio na realização dos testes biológicos.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica, especialmente do LAQUIP, pelo carinho, amizade e pela convivência agradável durante essa jornada.

A todos os amigos do Departamento de Farmacologia, especialmente do laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular, pela acolhida no laboratório e amizade.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, e CNPq pelo imprescindível apoio financeiro.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	01
1.1 Acidentes com serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	01
1.2 Aspectos gerais do veneno crotálico.....	05
1.3 Neurotoxinas.....	09
1.4 Crotoxina.....	11
1.5 Fosfolipase A ₂	16
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Venenos e Reagentes.....	24
3.2 Cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-75.....	24
3.3 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC.....	24
3.4 HPLC de fase reversa.....	25
3.5 Análise de aminoácidos.....	25
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	26
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina.....	26
3.8 Determinação da atividade da PLA ₂	27
3.9 Estudos cinéticos da PLA ₂	28
3.9.1 Determinação do comportamento cinético.....	28
3.9.2 Efeito inibitório da crotapotina.....	29
3.9.3 Efeito do pH na atividade da PLA ₂	29
3.9.4 Efeito de compostos na atividade da PLA ₂	29
3.9.5 Efeito da temperatura na atividade da PLA ₂	29
3.10 Animais.....	29

3.11 Medida da atividade neurotóxica em nervo frênico de músculo diafragma de camundongo	30
3.12 Medida da atividade neurotóxica em músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	30
3.13 Análise estatística.....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Cromatografia do veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i> em coluna Superdex G75.....	32
4.2 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC.....	32
4.3 Cromatografia da fração crotoxina em HPLC de fase reversa.....	35
4.4 Eletroforese em PAGE-SDS e PAGE-SDS-Tricina.....	37
4.5 Análise de aminoácidos.....	39
4.6 Estudos cinéticos.....	40
4.6.1 Comportamento cinético.....	40
4.6.2 Efeito de íons metálicos.....	40
4.6.3 Efeito inibitório da crotapotina.....	41
4.6.4 Efeito do pH.....	41
4.6.5 Efeito da temperatura.....	41
4.7 Estudo miográfico das amostras de veneno bruto e crotoxina de <i>C. d. cascavella</i>	48
4.7.1 Estimulação indireta em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	48
4.7.2 Respostas ao efeito contraturante da acetilcolina e do potássio.....	48
4.7.3 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....	58
5. Discussão.....	64
6. Conclusões.....	74
7. Apêndices.....	75
8. Referências bibliográficas.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Crotalus durissus cascavella</i>	1
Figura 2. Sítio de hidrólise das fosfolipases.....	16
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA ₂	19
Figura 4. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA ₂ isoladas do veneno total de serpentes.....	20
Figura 5. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G-75 em LC 650 do veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	33
Figura 6. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC em coluna Protein pack SW300 do veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i> (6a) e do veneno total de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (6b).....	34
Figura 7. Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa em coluna C-18 μ -Bondapak da crotoxina (III) de <i>Crotalus durissus cascavella</i> (a) e de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (b).....	36
Figura 8. Eletroforese em PAGE-SDS a 12,5% do veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i> e de suas frações crotoxina (III) e fosfolipase A ₂ (F6).....	38
Figura 9. Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina do veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i> e de suas frações crotoxina, crotapotinas (F3 e F4) e fosfolipase A ₂ (F6).38	
Figura 10. Atividade fosfolipásica em nmoles/min da PLA ₂ , crotoxina (CRTX) e veneno total (VT) de <i>C. d. cascavella</i>	42

Figura 11. Efeito da concentração de substrato na cinética da PLA ₂ de <i>C. d. cascavella</i>	43
Figura 12. Influência de íons na atividade da PLA ₂ de <i>C. d. cascavella</i>	44
Figura 13. Efeito inibitório da crotapotina sobre a atividade da PLA ₂ de <i>C. d. cascavella</i>	45
Figura 14. Efeito da variação de pH sobre a atividade da PLA ₂ de <i>C. d. cascavella</i> ...46	
Figura 15. Efeito da variação de temperatura sobre a atividade da PLA ₂ de <i>C. d. cascavella</i>	47
Figura 16. Bloqueio neuromuscular em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho induzido pelo veneno total de <i>C. d. cascavella</i>	50
Figura 17. Efeito do veneno de <i>C. d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).....	51
Figura 18. Efeito do veneno de <i>C. d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).....	52
Figura 19. Bloqueio neuromuscular em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho induzido pela crotoxina de <i>C. d. cascavella</i>	53
Figura 20. Efeito da crotoxina do veneno de <i>C. d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).....	54

Figura 21. Efeito da crotoxina do veneno de <i>C. d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).....	55
Figura 22. Efeito do veneno total de <i>C. d. cascavella</i> sobre as respostas da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho à acetilcolina e potássio.....	56
Figura 23. Efeito da crotoxina de <i>C. d. cascavella</i> sobre as respostas da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho à acetilcolina e potássio.....	57
Figura 24. Efeito do veneno total de <i>C. d. cascavella</i> sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta.....	60
Figura 25. Efeito do veneno de <i>C. d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta.....	61
Figura 26. Efeito da crotoxina de <i>C. d. cascavella</i> sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta.	62
Figura 27. Efeito da crotoxina de <i>C.d. cascavella</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero de serpente envolvida.....	02
Tabela 2. Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente.....	03
Tabela 3. Proteínas biologicamente ativas encontradas nos venenos das serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	06
Tabela 4. Composição de Aminoácidos das frações fosfolipase A ₂ (F6), crotapotina (F3) e crotapotina (F4), isoladas a partir da crotoxina de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	39
Tabela 5. Tempo necessário para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, incubado com o veneno e crotoxina de <i>C. d. cascavella</i>	49
Tabela 6. Tempo necessário para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação nervo frênico de diafragma de camundongo, incubado com o veneno e crotoxina de <i>C. d. cascavella</i>	59

ABREVIACÕES

μ (micro)	Fator de multiplicaco 10^{-06}
μ -Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária.
A ₂₈₀	Absorbância em 280 nm
AMBIC	Bicarbonato de amônio
C18	18 High Carbon Load, High activity sílica
DTT	Ditiotreitol
HPLC	High (Pressure/Performance) Liquid Chromatography
kDa	Kilo Daltons, 1Da  aproximadamente o peso molecular de um átomo de hidrognio
LC	Liquid chromatography - Sistema cromatográfico HPLC (baixa pressão) de purificaco de proteínas biocompatível da Waters.
n (nano)	Fator de multiplicaco 10^{-09}
Opa	Orthophthalaldehyde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio
Superdex G-75	Gel de filtração composto por matriz de dextrano e agarose.
TEMED	N-N'-N'-Tetrametiletilenodiamina
TFA	cido Trifluoroacético
Tris	Tris[Hidroximetil]aminometano
V ou v	Volts

ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS¹

Aminoácidos	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

¹Segundo nomenclatura do IUPAC

Resumo

A serpente *Crotalus durissus cascavella* é encontrada no cerrado do nordeste do Brasil (BARRAVIERA, 1990) e apesar de pouco estudada sua picada constitui um importante problema de saúde pública (MARTINS et al., 1998). A crotoxina é um complexo heterodimérico com atividade de fosfolipase A_2 sendo o principal componente neurotóxico do veneno da Cascavel Sul Americana *Crotalus durissus terrificus*. A crotoxina atua bloqueando a transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular causando uma paralisia flácida nas vítimas. O complexo crotoxina consiste em uma fosfolipase A_2 (PLA₂), componente básico, e um componente ácido, não enzimático conhecido como crotapotina. A crotoxina do veneno de *C. d. terrificus* tem sido extensivamente estudada, enquanto que a crotoxina de outros venenos de *Crotalus durissus sp* tem sido pouco investigada.

O objetivo deste trabalho foi a caracterização bioquímica e biológica do veneno e da crotoxina de *Crotalus durissus cascavella*, permitindo também um melhor entendimento do complexo crotoxina (PLA₂ e crotapotina).

PLA₂ e crotapotina, foram purificadas através de dois passos cromatográficos: cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-75 e cromatografia em HPLC de fase reversa. A análise cromatográfica em HPLC de fase reversa revelou quatro isoformas de crotapotina (F2, F3, F4 e F5) e apenas uma PLA₂ (F6) na crotoxina do veneno de *C. d. cascavella*. A crotoxina de *C. d. terrificus*, ao contrário, contém três isoformas de PLA₂ (Cdt F15, F16 e F17) e somente duas isoformas de crotapotina (Cdt F5 e F7). O grau de pureza das frações foi confirmado pela eletroforese em PAGE-SDS-Tricina onde mostrou que PLA₂ e crotapotina migram como uma única banda com massa molecular estimada de 15 kDa e 9 kDa, respectivamente.

A composição de aminoácidos da PLA₂ mostrou uma grande quantidade de resíduos de meia-cisteína e um alto conteúdo de resíduos básicos, enquanto que as crotapotinas F3 e F4 mostraram maior quantidade de resíduos carregados negativamente.

Para uma melhor caracterização bioquímica avaliou-se a cinética da enzima PLA₂ de *C. d. cascavella*. A PLA₂ mostrou um comportamento alostérico, com atividade máxima em pH 8,3 e 35-40°C. A PLA₂ de *C. d. cascavella* requer Ca²⁺ para exibir sua atividade, mas foi inibida por Zn²⁺ e Cu²⁺. Crotapotina e heparina inibiram a atividade catalítica da enzima atuando como inibidores alostéricos.

Com o objetivo de estudar a atividade biológica do veneno e da crotoxina de *C. d. cascavella* foi verificado a neurotoxicidade em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo e preparação *biventer cervicis* de pintainho. O veneno de *C. d. cascavella* aqui reportado, bem como seu componente crotoxina, apresentou potente atividade neurotóxica, principalmente em preparação *biventer cervicis* de pintainho. O estudo miográfico, portanto, revelou que a preparação *biventer cervicis* de pintainho é mais sensível ao efeito paralisante do veneno e crotoxina quando comparada à preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.

A principal conclusão deste trabalho é que o veneno de *C. d. cascavella* contém pelo menos quatro isoformas de crotoxina formadas por diferentes combinações das crotapotinas com uma única isoforma de PLA₂. Essa situação difere da crotoxina do veneno de *C. d. terrificus*, onde a heterogeneidade resulta da presença de três ou quatro isoformas de PLA₂. Desde que a toxicidade do veneno depende principalmente de seu conteúdo de crotoxina, a presença das isoformas pode contribuir para variações na potência da neurotoxicidade.

Abstract

Crotalus durissus cascavella is a snake usually found in scrubland of Brazilian Northeast (BARRAVIERA, 1990) and in spite of little studied its bite constitutes an important public health problem (MARTINS et al., 1998). The crotoxin is a heterodimeric complex with phospholipase A_2 activity and is the main neurotoxic component in venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxin acts blocking the transmission of nervous pulses in the neuromuscular junction causing a flaccid paralysis in the victims. The crotoxin complex consists of a phospholipase A_2 (PLA₂), basic component, and an acid component, nonenzymatic known as crotopotin. The crotoxin of the *C. d. terrificus* venom has been studied extensively, while crotoxin of others *Crotalus durissus sp* venoms have been poorly investigated.

The objective of this work was the biochemical and biological characterization of the venom and of the crotoxin of *Crotalus durissus cascavella*, also allowing a better understanding of the crotoxin complex (PLA₂ and crotopotin).

PLA₂ and crotopotin, were purified through two chromatography's steps: molecular exclusion chromatography in Superdex G-75 and in HPLC of reverse phase. The chromatographic analysis in HPLC of reverse phase revealed four crotopotin isoforms (F2, F3, F4 and F5) and just a PLA₂ (F6) in the crotoxin of the *C. d. cascavella venom*. Crotoxin from *C. d. terrificus* contained three PLA₂ isoforms (Cdt F15, F16 and F17), but only two crotopotin isoforms (Cdt F5 e F7). The degree of purity of the fractions was confirmed by the electrophoresis in Page-SDS-Tricina that showed that PLA₂ and crotopotin migrated as single band with estimated molecular masses of 15 kDa and 9 kDa, respectively. The composition of amino acids of PLA₂ showed a great amount of residues of half-cysteines and a high

content of basic residues, while the crotopotins F3 and F4 showed larger amount of residues carried negatively.

For a better biochemical characterization, the kinetics of the enzyme PLA₂ of *C. d. cascavella* was evaluated. The PLA₂ showed allosteric behavior, with maximal activity at pH 8,3 and 35-40°C. The *C. d. cascavella* PLA₂ required Ca²⁺ for activity, but was inhibited by Cu²⁺ and Zn²⁺. Crotopotin and Heparin inhibited the catalytic activity of the enzyme by acting as allosteric inhibitors.

Aiming to study the biological activity of the venom and of the crotoxin of *C. d. cascavella* the neurotoxicity was verified in the mouse phrenic nerve diaphragm preparation and chick biventer cervicis preparation. The *C. d. cascavella* venom here reported, as well as its crotoxin component, presented potent neurotoxic activity, mainly in chick biventer cervicis preparation.

The myographic study also revealed remarkable differences in the sensibility of the mouse phrenic nerve diaphragm preparation and chick biventer cervicis preparation. The preparation mouse nerve-muscle was shown less sensitive to the action neuromuscular blocking of both crotoxin and total venom, when submitted to indirect stimulus.

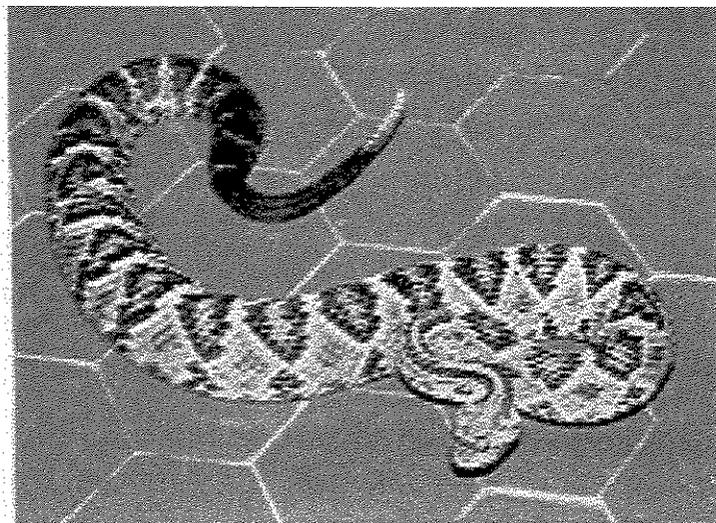
The main conclusion of this work it is that *C. d. cascavella* venom contains at least four crotoxin isoforms formed by different combinations of crotopotins with the single PLA₂ isoform. This situation differs from that of crotoxin in *C. d. terrificus* venom, where the heterogeneity results from the presence of three or four PLA₂ isoforms. Since the toxicity of the venom depends mainly on its content of crotoxin, the presence of isoforms may contribute to variations in neurotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes com serpentes do gênero *Crotalus*

O estudo dos venenos animais e de suas toxinas é da mais alta importância, pois somente através dele é possível adquirir conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituírem-se medidas eficientes em seu tratamento. Além disso, o estudo de toxinas tem revelado substâncias que vem contribuindo, de modo decisivo, para o esclarecimento, principalmente em nível molecular, de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos. O estudo farmacológico dos venenos animais tem ainda revelado algumas substâncias promissoras em terapêutica, sendo possível que a sua contribuição se torne mais extensa e importante nesse setor (VITAL BRAZIL, 1982).

Fig. 1. *Crotalus durissus cascavella* (SORENSEN, 2000).



Os acidentes ofídicos têm grande importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade. A Organização Mundial de Saúde tem estimado que eles resultam em aproximadamente 40.000 mortes por ano (MARCONDES, 1993). Em muitas partes do Brasil, acidentes ofídicos são um importante problema de saúde pública, com uma alta morbidade e mortalidade (AMARAL et. al., 1986). Os ofídios peçonhentos brasileiros são os integrantes da família Elapidae, às quais pertence o gênero *Micrurus* (corais), e à família Viperidae que incluem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucus) e *Bothrops* (jararacas). O gênero *Crotalus* apresenta a segunda maior porcentagem (6,2%) de acidentes registrados no país, podendo chegar a até 30% em algumas regiões (Tab. 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Tab. 1. Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero de serpente envolvida. Brasil – 1990-1993 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Distribuição	N.º acidentes	Porcentagem (%)
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não Informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

As cascavéis da América do Sul pertencem todas à espécie *durissus* (*Crotalus durissus*). Reconhecem-se hoje muitas subespécies de *C. durissus*, das quais cinco em território brasileiro (HOGE, 1965; HOGE & ROMANO, 1972): *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*.

A toxicidade do veneno crotálico é muito superior ao bothrópico (VITAL BRAZIL, 1982). Acidentes ofídicos envolvendo espécies do gênero *Crotalus* são geralmente sérios e freqüentemente fatais na ausência de tratamento adequado e específico (BARRAVIERA et al., 1989). Apresenta o maior índice de letalidade (1,87%) (Tab. 2) devido à freqüência com que evolui para insuficiência renal aguda, que é a mais séria complicação do envenenamento crotálico humano (CUPO et al., 1988) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Tab. 2. Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente. Brasil – 1990-1993
MINISTÉRIO DA SAÚDE (1998).

Gênero	N.º casos	N.º óbitos	Letalidade (%)
<i>Bothrops</i>	59.619	185	0,31
<i>Crotalus</i>	5.072	95	1,87
<i>Lachesis</i>	939	9	0,95
<i>Micrurus</i>	281	1	0,36
Não Informados	13.339	69	0,52
Total	79.250	359	0,45

O diagnóstico clínico do envenenamento crotálico baseia-se, principalmente, na observação de manifestações sistêmicas decorrentes das ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes do veneno (ROSENFELD, 1971).

A atividade neurotóxica é conseqüência do bloqueio na junção neuromuscular causando uma paralisia flácida, e caracterizam a face miastênica (face neurotóxica de Rosenfeld) evidenciadas por ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face, alteração do diâmetro pupilar, incapacidade de movimentação do globo ocular

(oftalmoplegia), podendo existir dificuldade de acomodação (visão turva) e ou visão dupla (diplopia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

A atividade miotóxica parece ser responsável pelas dores musculares generalizadas (mialgias) e por discreto edema no local da picada. A urina de cor avermelhada ou de tonalidade mais escura é a manifestação clínica mais evidente da intensidade da rabdomiólise, sendo a mioglobínúria responsável pela insuficiência renal aguda. Em conseqüência disso podem ocorrer grandes elevações séricas de creatinofosfoquinase e da desidrogenase láctica (AZEVEDO-MARQUES et. al., 1982).

As manifestações nos locais da picada nos envenenamentos por cascavéis são pouco importantes diferindo dos acidentes botrópico e laquético. A atividade coagulante de pequena intensidade e a inexistência de atividade proteolítica faz com que, no local da picada, não haja alterações ou, quando existirem, sejam reduzidas a um discreto edema ao redor do ponto de inoculação do veneno (VITAL BRAZIL, 1982 ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1987). No caso da *Crotalus durissus cascavella* especificamente danos no local da picada têm sido reportados como sendo mínimos ou ausentes (AZEVEDO-MARQUES et al., 1982).

1.2. Aspectos gerais do veneno crotálico

O veneno crotálico é uma mistura complexa de proteínas, incluindo enzimas, compostos biologicamente ativos e toxinas. Geralmente ele contém um grande número de componentes protéicos (Tab. 3) apresentando grande variedade de atividades farmacológica e enzimática. Quanto ao perfil eletroforético, os venenos de diferentes espécies de serpentes do gênero *Crotalus* mostram numerosas bandas. Um total de 33 bandas eletroforéticas é visível nos venenos de 18 espécies e 8 subespécies de *Crotalus* (TU, 1982).

O veneno seco é constituído por 90% de proteínas. As proteínas são moléculas carregadas que se ligam com cátions ou ânions, e assim o veneno das serpentes também contém uma grande variedade de compostos inorgânicos. Muitas enzimas presentes nos venenos requerem íons para exibir sua atividade. Em alguns casos, íons (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2}) servem de cofatores sem os quais a enzima não apresenta atividade catalítica. Carboidratos também podem ser encontrados, mas estão presentes na forma de glicoproteínas (TU, 1982).

Quanto às enzimas, a fosfolipase A_2 (PLA_2) é a mais comumente encontrada nos venenos das serpentes. As neurotoxinas pré-sinápticas geralmente têm atividade de PLA_2 . Até o momento são descritas na literatura duas neurotoxinas pré-sinápticas isoladas do veneno crotálico: Mojave toxina (*Crotalus scutulatus scutulatus*) e crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*). Ambas toxinas são compostas de subunidades ácidas e básicas. Essas toxinas mostram o componente B (básico) com atividade fosfolipásica (TU, 1982).

Tab. 3. Proteínas biologicamente ativas encontradas nos venenos das serpentes do gênero *Crotalus* (TU, 1982).

Enzimas hidrolíticas

Fosfolipase A₂

Fosfodiesterase

Fosfomonoesterase

Fosfatase não-específica

Fosfatase específica: 5'-nucleotidase

Enzimas proteolíticas

Endopeptidase

Exopeptidase: dipeptidase, tripeptidase

Colagenase

Elastase

Arginina éster hidrolase

Enzima liberadora de bradicinina

Enzimas envolvidas na coagulação sanguínea

Hialuronidase

NAD nucleosidase

Enzimas não-hidrolíticas

L-amino oxidase

Outras

Neurotoxinas: Mojave toxina, crotoxina, proteínas básicas miotóxicas

Toxinas hemorrágicas

Miotoxinas

Citotoxinas, nefrotoxinas: os venenos das cascavéis tem atividade citotóxica e nefrotóxica. Desde que tais toxinas não foram ainda isoladas, não está claro se há tais toxinas, ou se as ações são devido ao largo efeito de outras toxinas

Os venenos das *Crotalus durissus sp* são constituídos basicamente das seguintes toxinas que já foram purificadas:

-Convulxina (PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981), que quando injetada em gatos produz perda do equilíbrio, convulsões, alterações visuais e distúrbios gastrointestinais e respiratórios. Os sintomas começam poucos segundos depois da injeção. A convulxina induz convulsões em camundongos seguidas de morte. A convulxina produz ainda agregação plaquetária e isso pode levar a convulsões resultantes da formação de microêmbolos, com subsequente isquemia cerebral, ou enorme liberação de substâncias farmacologicamente ativas pelo organismo (PRADO-FRANCESCHI et al., 1981).

-Giroxina (BARRIO, 1961), uma proteína com atividade semelhante a trombina e não letal. Quando injetada intravenosamente em ratos, produz alterações características no equilíbrio resultando em fenômenos motores tais como movimentos em círculos em uma única direção (HAWGOOD, 1982).

-Crotamina (GONÇALVEZ & ARANTES, 1956), produz espasmos no músculo esquelético de mamíferos ocasionando uma paralisia espasmódica de origem periférica (TOYAMA et al., 2000). A crotamina em baixas concentrações é capaz de induzir a um efeito anestésico cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido (MANCIN et al., 1998). Também tem sido demonstrada a presença de várias isoformas de crotamina (SMITH & SCHMIDT, 1990; TOYAMA et al., 2000).

-Crotoxina (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938), neurotoxina presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Sua ação neurotóxica é de origem periférica e faz parte das PLA₂ neurotóxicas mais comumente denominadas de β -neurotoxinas (BON, 1997). A grande toxicidade do veneno da Cascavel Sul Americana, assim como suas ações paralisantes são devidas a crotoxina. A crotoxina é aproximadamente duas vezes mais tóxica do que o veneno total (VITAL BRAZIL, 1982).

1.3. Neurotoxinas

Os efeitos neurotóxicos (hipotonia muscular, paralisia flácida de músculos da face, pescoço, membros, tronco, laringe, faringe e da respiração) produzidos pelas peçonhas ofídicas são devidos à ação na junção neuromuscular de constituintes denominados neurotoxinas. As neurotoxinas são divididas em dois grupos distintos: neurotoxinas pós-sinápticas e neurotoxinas pré-sinápticas (VITAL BRAZIL, 1982).

As neurotoxinas pós-sinápticas, também chamadas de α -toxinas, atuam impedindo a ligação da acetilcolina a seu receptor (BON, 1997). As neurotoxinas pré-sinápticas incluem toxinas que inibem ou facilitam a liberação do neurotransmissor do terminal nervoso motor. Dois tipos de neurotoxinas pré-sinápticas tem sido reconhecidas: (1) “neurotoxinas facilitatórias”, as quais são destituídas de atividade enzimática – elas ou inibem a acetilcolinesterase ou bloqueiam os canais de K^+ voltagem-sensível, por exemplo dendrotoxinas. (2) β -neurotoxinas, as quais são caracterizadas por apresentar atividade fosfolipásica (BON, 1997). As β -neurotoxinas são consideradas potentes neurotoxinas as quais bloqueiam a transmissão neuromuscular, principalmente por modificação na liberação do neurotransmissor (HAWGOOD & BON, 1990).

A crotoxina é a principal proteína constituinte do veneno da Cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus terrificus*) e pertence a classe das β -neurotoxinas. Todas β -neurotoxinas são fosfolipases A_2 . Algumas associam a atividade enzimática e a neurotoxicidade em uma única cadeia, tais como a ammodytoxina A, da *Vipera ammodytes* (RITONJA & GUBENSEK,

1985). Nas β -bungarotoxinas, da *Bungarus muticinctus*, uma fosfolipase A_2 é ligada covalentemente a uma subunidade análoga a inibidores de tripsina pancreática (KONDO et al., 1982 a,b). Todas outras β -neurotoxinas, incluindo a crotoxina, são oligômeros não-covalente (DELOT & BON, 1993).

A estrutura quaternária das β -neurotoxinas é preferencialmente heterogênea, todas porém tem a presença uniforme de uma PLA_2 (BON, 1997). As β -neurotoxinas podem ser divididas em dois grupos:

- Neurotoxinas PLA_2 monoméricas, que estão presentes no veneno da família Elapidae as quais são homólogas a PLA_2 (tipo I) do pâncreas de mamífero. Também estão presentes no veneno da família Viperidae, e contém uma PLA_2 homóloga ao tipo II extracelular de mamífero de origem não pancreática (BON, 1997).

- Neurotoxinas PLA_2 multiméricas, em que pelo menos uma de suas subunidades é uma PLA_2 ativa. As β -neurotoxinas multiméricas são subdivididas em dois grupos de acordo com a natureza química de suas subunidades. No primeiro grupo estão as β -neurotoxinas que são compostas por duas, três ou cinco subunidades polipeptídicas que são homólogas a enzimas PLA_2 , mas algumas delas não possuem atividade fosfolipásica. Portanto, elas são β -neurotoxinas homogêneas, constituídas somente por subunidades de PLA_2 . Existe um outro grupo de β -neurotoxinas multiméricas que é constituído por uma associação heterogênea de uma PLA_2 com um outro tipo de cadeia polipeptídica. Esse é o caso da crotoxina, que é uma associação heterogênea e não covalente de uma PLA_2 com uma crotapotina (BON, 1997).

1.4. Crotoxina

A crotoxina foi isolada em 1938 por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT. Seus principais componentes são uma fosfolipase A₂ (PLA₂), fortemente básica, denominada componente B por HENDON & FRAENKEL-CONRAT, (1971) e uma proteína ácida, denominada crotapotina por RÜBSAMEN et. al., (1971) e componente A por HENDON & FRAENKEL-CONRAT (1971). A PLA₂ é pouco tóxica, e a crotapotina, desprovida de atividade enzimática e atóxica. Combinam-se espontaneamente, e o complexo assim formado apresenta a toxicidade da toxina primitiva (crotoxina). A função da crotapotina parece ser a de impedir a ligação da fosfolipase em várias estruturas, orientando-a principalmente para as membranas pré e pós-sináptica da junção neuromuscular (BON et al., 1979; VITAL BRAZIL, 1982). A razão molar das duas subunidades na crotoxina é de 1:1 (NAKAZONE, 1978). A fosfolipase A₂ sozinha é muito menos tóxica do que a crotoxina mas sua atividade enzimática é mais alta. Quando a fosfolipase A₂ combina-se com a crotapotina a toxicidade é restaurada embora o complexo tenha baixa atividade enzimática de fosfolipase A₂ (RÜBSAMEN et al., 1971).

A crotoxina é a principal fração do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, e bloqueia a transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1966) do qual decorrem as paralisias motoras apresentadas pelos pacientes. A junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização e liberação do neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolina liberada combina-se com os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esta ligação está relacionada ao potencial da placa terminal que ao atingir o limiar de

excitabilidade desencadeia o potencial de ação muscular que se propaga ao longo dos túbulos "T" induzindo a contração muscular. Para explicar a inibição da contração muscular pela crotoxina tem sido proposto um mecanismo de ação molecular envolvendo atividade pré-sináptica (VITAL BRAZIL, 1966) e pós-sináptica (BON et al., 1979). Na ação pré-sináptica a crotoxina genericamente inibe a liberação do neurotransmissor acetilcolina (VITAL BRAZIL & EXCELL, 1971; CHANG & LEE, 1977). E na ação pós-sináptica atua bloqueando a resposta à acetilcolina através da estabilização do receptor de acetilcolina a um estado inativo (BON et al., 1979).

Existem atualmente dois modelos para explicar a interação da crotoxina com membranas pré-sinápticas: o modelo da dissociação e o do complexo ternário transiente. No primeiro modelo, quando a crotoxina se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA₂ e esta última se liga então ao receptor. No segundo modelo, a crotoxina primeiramente se liga ao seu receptor de membrana e só então ocorre a dissociação de seus componentes com liberação da crotapotina, enquanto a PLA₂ permanece ligada ao receptor (DELOT & BON, 1993).

A crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA₂ (BREITHAUPT, 1976). Apesar da crotapotina diminuir a atividade catalítica da PLA₂ e ser considerada farmacologicamente inativa quando isolada, ela possui dentro da molécula de crotoxina uma função de chaperone do componente básico (FAURE et al., 1993), pois previne a ligação não específica da PLA₂ com outras membranas biológicas que não estão envolvidas em suas atividades fisiológicas bem como farmacológicas (BON et al., 1979).

LANDUCCI et al., (1995), mostrou que em condições experimentais a crotapotina também possui atividade antiinflamatória quando aplicada *in vivo* através da injeção intraperitonal ou por via oral. E que esta atividade não é devido à liberação de corticosteróides endógenos ou inibição da atividade de ciclo-oxigenase. Acredita-se que a crotapotina poderia interagir com PLA₂ extracelulares geradas durante o processo inflamatório levando a uma redução da atividade hidrolítica destas últimas.

A crotoxina isolada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT (1938), apesar de se mostrar homogênea e constituída por uma mistura de PLA₂ e crotapotina, é na realidade composta por uma mistura de várias isoformas, as quais, estão também presentes em diferentes lotes de venenos coletados de várias serpentes. A presença dessas isoformas de crotoxina resultam de diferentes combinações das isoformas de suas duas subunidades. Estudos eletroforéticos e cromatográficos demonstraram a existência de muitas isoformas de crotoxina, e a presença de várias isoformas no veneno de uma única espécie, indicando a existência de vários genes codificantes para essas fosfolipases neurotóxicas. Essas isoformas parecem ser resultantes ou de modificações pós-transcricionais, que ocorrem sobre uma única forma de RNAs mensageiros, ou a expressão de diferentes RNAs mensageiros (FAURE & BON, 1988; FAURE et. al., 1994).

Além de ter um efeito neurotóxico, a crotoxina é também miotóxica, afetando diretamente as células do músculo esquelético (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1981). Evidências clínicas claramente indicam que o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* é caracterizado por uma miotoxicidade sistêmica, demonstrada pela presença de mioglobinúria, mioglobinemia e por um drástico aumento no nível sérico de creatina quinase,

lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (AZEVEDO-MARQUES et al., 1982). Os sinais clínicos evidentes da ação miotóxica são dores musculares generalizadas (mialgias), a urina apresenta uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura (mioglobinúria), que constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise). Desde que a crotoxina representa uma grande porcentagem deste veneno, é provável que essa miotoxicidade seja devido à ação da crotoxina nas células musculares. A PLA₂ induz a danos nos músculos de ratos enquanto a crotapotina é destituída de efeito miotóxico (KOUYOUMDJIAN et al., 1986), no entanto ela potencializa a atividade miotóxica da PLA₂. A patogênese do dano causado ao músculo esquelético depois da injeção intramuscular de crotoxina foi estudada por GOPALAKRISHNAKONE et al. (1981). Quatro horas depois da administração da toxina, há evidências histológicas e ultraestruturais de mionecroses. Entre 24 e 48 horas, há um proeminente infiltrado inflamatório composto principalmente de macrófagos localizado dentro do espaço demarcado pela lâmina basal das células musculares necrosadas.

Crotoxina (15 a 50 µg/ml) produz ainda uma agregação de plaquetas humanas lavadas de modo dose-dependente e irreversível, e induz a liberação de tromboxano B₂. Embora a agregação plaquetária in vivo possa causar falha renal e mionecrose devido a isquemia, permanece por ser determinado se essa propriedade da crotoxina pode ser responsável por algumas manifestações clínicas observadas no envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* (LANDUCCI et al., 1994).

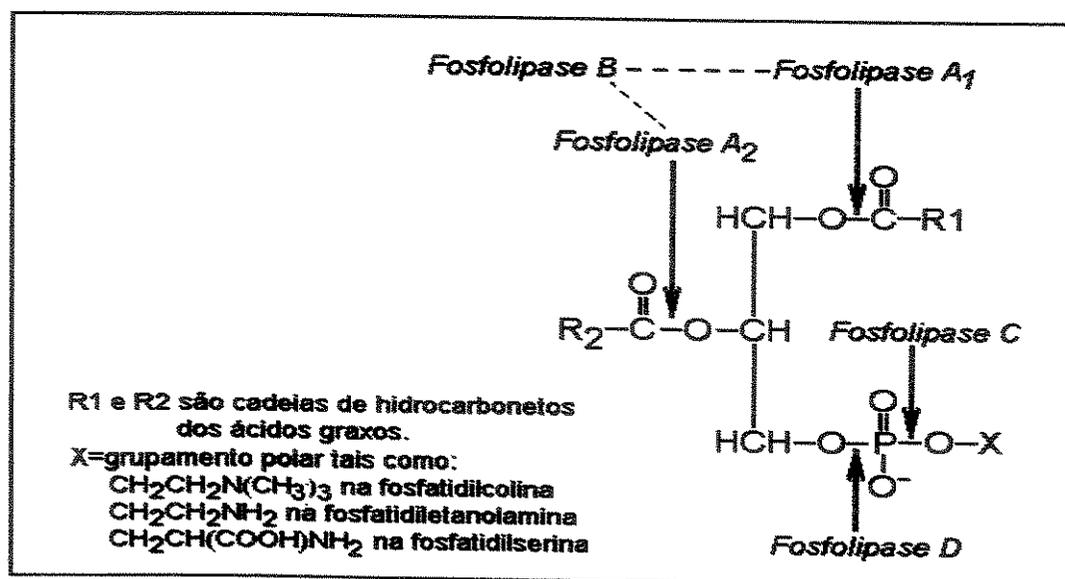
CARDOSO & MOTA (1997), estudando o efeito da crotoxina no sistema imune, verificaram que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* bem como seu componente

crotoxina tem um efeito inibitório na resposta humoral, mas não na resposta celular imune. Pouco se sabe sobre o efeito do veneno de serpentes no sistema imune. E estudos estão sendo feitos para verificar como o veneno total ou seu principal componente poderiam modular a supressão da resposta imune.

1.5. Fosfolipase A₂

As fosfolipases são enzimas esterolíticas que catalisam a hidrólise dos glicerofosfolípideos. Essas enzimas são separadas em várias classes de fosfolipases baseados no sítio de hidrólise, nomeadas A₁, A₂, B, C e D. As enzimas fosfolipases A₂ (fosfatidil-acil-hidrolase, EC 3.1.1.4) hidrolisam o 3-*sn*-fosfoglicerídeos na posição 2 na ligação acil-éster (Fig. 2). Elas estão presentes no pâncreas de mamíferos e em venenos de animais. As enzimas pancreáticas de mamíferos possuem uma função digestiva, enquanto, as enzimas PLA₂ de venenos mostram uma grande variedade de efeitos farmacológicos (KINI, 1997).

Fig. 2: Sítio de hidrólise das fosfolipases (KINI, 1997).



A reação catalisada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos (HANAHAN, 1971). As PLA₂ são consideradas como modelos nos processos catalíticos que se desenvolve na interface lipídio/água, pois atuam

preferencialmente em substratos agregados como micelas, bicamadas ou lipoproteínas. Isto explica a ampla distribuição das PLA₂ no reino animal com participação em inúmeros fenômenos fisiopatológicos e/ou fisiológicos (FLEER et al., 1981).

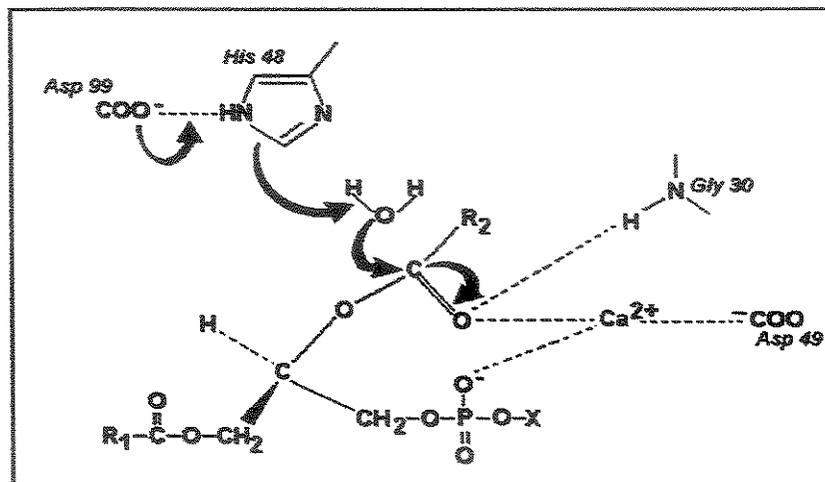
As fosfolipases A₂ podem ser classificadas em quatro grandes classes: I, II, III e IV, de acordo com sua seqüência de aminoácidos. As PLA₂ das classes I, II e III foram isoladas como enzimas extracelulares, caracterizadas por um número alto de pontes dissulfeto em torno de 5 a 7 pontes, possuem baixo peso molecular em torno de 12 a 15 kDa. As PLA₂ da classe IV são de alto peso molecular de origem intracelular, que tem como substrato específico o ácido araquidônico. Existem evidências da presença de uma quinta classe de PLA₂ de origem intracelular independentes da presença de Ca²⁺ como cofator que foram identificados e purificados a partir do tecido cardíaco de cães. Estas PLA₂ não têm preferência pelo ácido araquidônico como ocorre nas PLA₂ da classe IV e seu peso molecular está em torno de 40 kDa (DENNIS, 1994).

As PLA₂ da classe I englobam principalmente as PLA₂ do pâncreas de mamíferos e dos venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae. As enzimas deste grupo contém cerca de 115 a 120 resíduos de aminoácidos e 7 pontes dissulfeto. As PLA₂ da classe II englobam as não pancreáticas humanas e dos venenos das serpentes da subfamília Crotalinae, que incluem os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, e da família Viperidae. Estas enzimas possuem cerca de 120 a 125 resíduos e 7 pontes dissulfeto. À classe III pertencem as PLA₂ dos venenos de abelhas e vespas. Diferentemente das outras classes de PLA₂, estas são glicoproteínas, contendo cerca de 130 a 135 resíduos de aminoácidos. A classe IV

engloba as PLA₂ citossólicas de células de mamíferos e as PLA₂ da classe V foram detectadas em células miocárdicas de humanos e cães (DENNIS, 1994; KINI, 1997).

A unidade catalítica das PLA₂ é constituída pelos resíduos de aminoácido His-48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp-99 e uma molécula de água (Fig. 3). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp-99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, e nesse momento o anel imidazólico da His-48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Após a hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolípideo a ser liberado (VERHEIJ et al., 1980). O mecanismo catalítico das PLA₂ de baixo peso molecular (14 kDa) envolve resíduos que participam da alça de ligação para íons Ca²⁺ nas PLA₂ clássicas que são, Tyr-28 (posição 28 na cadeia polipeptídica), Gly-30, Gly-32 e Asp-49. No mecanismo da catálise, o cálcio tem dupla função: fixação do grupamento fosfato do fosfolípideo e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição *sn*-2 do substrato (YANG, 1994). A amida NH da Gly-30 também foi sugerida como um fator importante na estabilização do estado de transição (VERHEIJ et al., 1980).

Fig. 3: Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA₂ (VERHEIJ et. al., 1980).



A PLA₂ é uma enzima digestiva produzida pelas glândulas de veneno da serpente justamente como as produzidas pelas glândulas salivares humanas. As PLA₂ são o componente mais letal do veneno de serpentes, além de sua atividade específica na digestão de lipídios, elas mostram uma gama variada de ações farmacológicas tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, edematogênica, miotóxica, atividade anticoagulante (Fig. 4) (KINI, 1997; KAISER et al., 1990).

Fig. 4. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ isoladas do veneno total de serpentes. (KINI, 1997).

Neurotoxicidade Neurotoxinas Pré-sinápticas Neurotoxinas Pós-sinápticas
Miotoxicidade Mionecrose Local Miotoxicidade Sistêmica
Cardiotoxicidade
Efeito anticoagulante
Iniciador da agregação plaquetária
Inibidor da agregação plaquetária
Atividade Hemolítica
Hemorragia Interna
Atividade antihemorrágica
Atividade Convulsionante
Atividade Hipotensiva
Atividade Edematogênica
Lesão de órgãos e tecidos.

Os efeitos farmacológicos observados em decorrência da ação da PLA₂ não são necessariamente causados apenas pela quebra de fosfolípidos de membranas biológicas. As PLA₂ parecem apresentar, além do sítio catalítico característico, sítio(s) farmacológico(s) distinto(s) do catalítico (YANG, 1994). Existe um modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA₂ que distingue nesta enzima os sítios catalítico e farmacológico. O sítio farmacológico da enzima teria alta ou baixa afinidade por determinado sítio-alvo presente na membrana celular. A presença do sítio-alvo distinguiria uma célula-alvo de uma célula-não alvo. Isso determinaria se a ligação da enzima à célula seria específica (presença do sítio-alvo, alta especificidade) ou não-específica (ausência do sítio-alvo, baixa especificidade, ocorre apenas quando há excesso de enzima). Depois da ligação inicial da PLA₂ ao seu alvo específico, a enzima induz a vários efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática (KINI & EVANS, 1989). Não há

correlação entre atividade enzimática e farmacológica. No entanto, nos casos onde os efeitos farmacológicos são independentes da atividade enzimática, a atividade catalítica pode aumentar a potência da atividade farmacológica. A substituição de alguns resíduos de aminoácidos na enzima pode alterar a eficiência catalítica e então refletir na alteração da potência farmacológica (KINI, 1997).

Algumas enzimas PLA₂ de venenos são farmacologicamente ativas por si só, enquanto outras requerem proteínas complementares para exibir sua potência farmacológica e letal completa, como é o caso da crotoxina. Em 1982, MARLAS & BON verificaram a importância da atividade fosfolipásica no bloqueio pós-sináptico exercido pela crotoxina. Em uma primeira série de experimentos eles usaram o brometo de p-bromofenacil, o qual especificamente alquila o resíduo de histidina, suprimindo dessa forma a atividade catalítica do componente B da crotoxina. O componente B alquilado combina-se com o A, embora com afinidade reduzida, e a crotoxina cataliticamente inativa fica totalmente destituída de toxicidade não bloqueando a resposta pós-sináptica. A necessidade da atividade fosfolipásica foi confirmada com outros testes, nos quais a atividade fosfolipásica foi inibida pela troca de íons Ca²⁺ por Sr²⁺ na solução fisiológica. Nessas condições experimentais, não houve bloqueio da transmissão pós-sináptica.

As PLA₂ de venenos de serpentes e as enzimas PLA₂ que atuam nos processos fisiológicos embora possuam similaridades estruturais e catalíticas, as de veneno causam destruição por interferir em processos fisiológicos da vítima, induzindo a uma variedade de efeitos farmacológicos. Um melhor entendimento poderia contribuir para clarificar esse complexo fenômeno desencadeado pelo acidente ofídico.

O presente trabalho propõe o isolamento de uma neurotoxina pré-sináptica do veneno de *C. d. cascavella*, uma serpente geralmente encontrada no cerrado do nordeste do Brasil (BARRAVIERA, 1990). Sua picada constitui um importante problema de saúde pública nessa região (MARTINS et al., 1998).

A serpente *Crotalus durissus cascavella* por ter um habitat restrito proporciona um modelo biológico com uma família de proteínas que puderam ter uma evolução diferenciada em relação a outras subespécies. A crotoxina e suas subunidades foram purificadas de seu veneno através de dois passos cromatográficos e foram caracterizadas físico-quimicamente. Essa nova PLA₂ foi caracterizada enzimaticamente contribuindo para o entendimento de sua atividade catalítica. Também tivemos como objetivo o estudo da atividade neurotóxica *in vitro* do veneno e da crotoxina de *C. d. cascavella* permitindo relacionar as atividades físico-químicas e biológica.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Purificação e isolamento da crotoxina de *Crotalus durissus cascavella*.
- Caracterização bioquímica de seus componentes (PLA₂ e crotapotina).
- Estudo cinético da enzima PLA₂ do veneno de *Crotalus durissus cascavella*.
- Caracterização farmacológica do veneno total e da crotoxina de *Crotalus durissus cascavella* em preparações neuromusculares isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo e músculo *biventer cervicis* de pintainho

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Venenos e reagentes

O veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi adquirido junto a Sigma Chemical. O veneno total de *Crotalus durissus cascavella* foi adquirido da Bio-Agents Serpentário Proteínas Bioativas Ltda. (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo).

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, foram obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad.

3.2. Cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-75

O veneno total de *Crotalus durissus cascavella* (50 mg) foi dissolvido em 1,0 ml de tampão bicarbonato de amônio (1 M, pH 8) até sua homogeneização. O homogenato foi então submetido a uma clarificação por centrifugação a 10.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Superdex G-75 (1x60 cm) em um aparelho LC 650E (Waters) e previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,2 M, pH 8). A eluição do material foi realizada usando-se o tampão bicarbonato de amônio (0,2 M, pH 8) a um fluxo constante de 0,3 ml/min. As amostras foram coletadas e a absorbância lida a 280 nm. As frações foram liofilizadas e guardadas a -20°C.

Este procedimento também foi adotado para a purificação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*.

3.3. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

O veneno de *C. d. cascavella* (20 mg) foi aplicado em uma coluna Protein pack 300SW (0,78X30 cm) e eluída com bicarbonato de amônia 0,2 M, pH 7,9, a um fluxo de 0,1 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm usando um 490 PDA UV/visible e as frações foram coletadas usando um coletor de frações automático Foxy 200. As frações correspondentes a crotoxina foram liofilizadas e estocadas a -20°C. O mesmo procedimento

foi adotado para o veneno de *C. d. terrificus*.

3.4. HPLC de fase reversa

20 mg da crotoxina liofilizada do veneno de *C. d. cascavella* e do veneno de *C. d. terrificus* foi dissolvida em 250 μ l de ácido trifluoroacético TFA 0,1% (v/v) (solvente A). A solução resultante foi clarificada por centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante aplicado a uma coluna C-18 μ -bondapak (0,78X30 cm) (Waters 991-PDA system). A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1% (solvente A) em água obtida por sistema Millil Q. A coluna foi eluída com um gradiente linear de acetonitrila 66% (0-100%, v/v) (solvente B) a um fluxo de 2,0 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações coletadas, liofilizadas e estocadas a -20°C .

3.5. Análise de aminoácidos

Os aminoácidos foram separados e analisados por HPLC de fase reversa com seu derivado OPA (orthophthalaldehyde), baseado no método descrito por JARRET et al. (1986). Uma Spherisorb ODS-2 coluna (5 mm, 4 x 250 mm) foi usada e eluída a 0,8 ml/min em um gradiente linear formado por soluções de 65% de metanol e tampão fosfato pH 7,25m (50 mM de fosfato dissódico, 1,5 ml de ácido acético, 20 ml de tetrahidrofurano, 20 ml de metanol em 1l de água). O gradiente aumentou a proporção de 65% de metanol, de 20 a 60% entre 0 a 25 min, 60 a 75% de 25 a 31 min, e 75 a 100% de 31 a 50 min. O efluente da coluna foi monitorado por um detector de fluorescência Shimadzu (model RF350) operando com um comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 480 nm.

Para análise dos aminoácidos Pro e Cys foi utilizado um sistema Acc-Tag da Waters adaptado para coluna usada para OPA. O padrão de aminoácidos usado foi o S-18 da Sigma.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8 contendo 0,2 % de SDS para solubilização das amostras, 0,1 % de N-N-N-N-Tetrametilenediamina (Temed) e 0,01% de persulfato de amônio (PSA) para polimerização. Após a polimerização deste, foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8; SDS 0,2%, Temed 0,1% e persulfato de amônio 0,01%.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, EUA). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra Tris-HCl, 0,08M, pH 6,8, contendo 10% (v/v) de Glicerol, 2% (m/v) de SDS; 0,02% (m/v) de azul de bromofenol. No caso das amostras reduzidas, foi empregado DTT na concentração final de 0,1M. A corrida eletroforética foi realizada a 30mA em temperatura ambiente utilizando tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, pH 8,3, contendo glicina 0,18 M e 0,1% (m/v) de SDS com duração aproximada de 2 horas.

Os géis foram retirados do sistema de placas e colocados em solução de Coomassie Blue R-250, 0,25% em metanol, ácido acético e água na proporção de 40:10:50 (v/v) por 12 horas a temperatura ambiente para coloração das bandas de proteínas. Em seguida foi descorado em solução de metanol, ácido acético e água na proporção de 40:10:50 (v/v).

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com a metodologia descrita por SHÄGGER & VON JAGOW (1987), a partir de uma solução estoque de acrilamida-bisacrilamida (49,5%T; 3%C) e tampão para gel (Gel Buffer). O gel de corrida compõe-se de

4,0 g de Glicerol 89%, em 10 ml de tampão para gel (Tris-HCl 3 M, SDS 0,3%, pH 8,43), PSA 0,025% (100 mg/ml), 6,1 ml de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e Temed 0,05%, em volume final de 30 ml para cada gel. O gel de separação (spacer gel) foi preparado com tampão de gel 10 ml, solução estoque de acrilamida 10 ml para um volume final de 30 ml com água Milli Q. Os géis foram adicionados simultaneamente entre duas placas de vidro (sistema duplo de placas SE 250 Might Small – Hoefer Scientific Instrumentos, San Francisco, USA), o gel superior foi confeccionado usando 1,0 ml de solução estoque de acrilamida em 3,1 ml de gel buffer, 100 µl de PSA (100 mg/ml) e 0,1% de Temed, em um volume final de 12,5 ml.

As amostras (10 a 50 µg de proteína) foram dissolvidas em tampão de amostra comercial (sample buffer, Laemmli – Sigma). No caso das amostras reduzidas, foi empregado DTT no mesmo tampão e em seguida, aplicadas no volume máximo de 15 µl. A corrida eletroforética foi desenvolvida a temperatura ambiente, em tampão cátodo Tris-HCl 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25 e tampão para o ânodo Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9, com duração aproximada de 7 horas sob corrente de 25 mA. Após a corrida o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo Coomassie blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para coloração das bandas de proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

3.8. Determinação da atividade da PLA₂

A atividade da PLA₂ foi medida usando o método descrito por CHO & KÉSDY (1991) e HOLZER & MACKESSY (1996), modificado para microplaca 96-well. A solução de substrato “stock” do 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid foi de 3,1 mM (0,96 mg/ml), dissolvido em acetonitrila. A solução de enzima “stock” foi de 1mg/ml dissolvida no tampão do ensaio. O ensaio padrão continha 200 µl de tampão (10 mM de Tris-HCL, 10 mM de CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8,0), 20 µl de substrato, 20 µl de água deionizada e 20 µl de PLA₂ em um volume final de 260 µl. Depois da adição da PLA₂ (20 µg), a mistura foi incubada por até 40 min a 37°C, com a absorbância sendo lida em intervalos de 10 min. A atividade enzimática foi

calculada baseada no aumento de absorvância depois de 20 min. Todos ensaios foram feitos em triplicata e as absorvâncias a 425 nm foram medidas usando um SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

A atividade fosfolipásica em nmoles/min também foi determinada para PLA₂, crotoxina e veneno total através de um ensaio padrão em tubos de ensaio contendo: 100µl de solução estoque de substrato 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid, 100µl de água deionizada, 1000µl de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM, pH 8,0) e 100µl de solução estoque enzima. A temperatura foi mantida a 37°C por um tempo de 20 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 100 µl de Triton X-100 a 25% e a leitura a 425 nm foi feita em um espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1201.

Uma curva padrão de absorvância em função da concentração do produto liberado (3-hidroxy-4-nitrobenzoic acid) mostrou que um aumento na absorvância de 0,10 AU a 425 nm foi equivalente a 25,8 nmoles de cromóforo liberado. O cromóforo tem um coeficiente de extinção de 5039 nesse sistema (HOLZER & MACKESSY, 1996).

3.9. Estudos cinéticos da PLA₂

Com as frações de PLA₂ purificadas foram realizados estudos cinéticos, os quais foram feitos em triplicatas, e os resultados obtidos a partir de suas médias.

3.9.1. Determinação do comportamento cinético

O efeito da concentração do substrato na atividade da enzima foi determinado medindo o aumento de absorvância depois de 20 min em tampão Tris-HCl, pH 8,0 a 37°C. Esse ensaio foi feito variando-se a concentração do substrato 3-nitro-4(octanoyloxy) benzoic acid. Também foi verificado o efeito de inibidores crotapotina e heparina na cinética da enzima. A inibição da atividade fosfolipásica por crotapotina foi determinada incubando as duas proteínas (1:1) por 30 min a 37°C e então medindo a atividade enzimática residual. A atividade inibitória da heparina foi medida incubando a PLA₂ (20 µg) com 5µl de heparina por um tempo de 30 minutos a 37°C. A atividade foi determinada como descrito no método 3.8.

3.9.2. Efeito inibitório da crotapotina

Esse ensaio foi realizado incubando a PLA₂ (20 µg) com concentrações crescentes de crotapotina, a partir de 0,25 µg/µl de solução estoque até 2 µg/µl, por um tempo de 30 minutos. Após esse tempo foi medida a atividade enzimática residual.

3.9.3. Efeito do pH na atividade da PLA₂

O efeito do pH no meio de ensaio foi realizado em meios de incubação preparados com diferentes valores de pH (4.0-10.0). Os tampões utilizados na concentração de 10 mM, foram: Citrato de sódio (pH 4,0-7,5), Tris (pH 7,8-8,8), Glicina (pH9,0-10,0). O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.

A atividade foi determinada como descrito em 3.8. A concentração de enzima utilizada foi idêntica à do item 3.8.

3.9.4. Efeito de compostos na atividade da PLA₂

A atividade da PLA₂ foi determinada na presença de metais (Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺). O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8, utilizando tampões: Tris-HCl (10mM), contendo os íons Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺ (10 mM), NaCl (100mM), com concentração de CaCl₂ subótimas (1mM) ou com ausência de CaCl₂. O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C. A atividade da mesma foi determinada de acordo com o método 3.8.

3.9.5. Efeito da temperatura na atividade da PLA₂

O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8. A temperatura, variada de 25-45°C, foi mantida por 20 minutos. A leitura a 425nm foi feita usando um SpectraMax 340 multiwell plate reader.

3.10. Animais

Foram utilizados para os ensaios biológicos camundongos Swiss (18-30g) obtidos do biotério central da UNICAMP. Também foram utilizados pintainhos machos HY-LINE W36 com peso entre 18 e 30 g (4 a 8 dias de vida) fornecidos pela Granja ITO S/A (Campinas-SP). Protocolo para o uso de animais em experimentos número: 290-1.

3.11. Medida da atividade neurotóxica em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo

Foram utilizadas preparações nervo frênico-diafragma de camundongo. A preparação foi removida cirurgicamente de animais anestesiados com hidrato de cloral (3mg/kg) e mortos por secção e sangria dos vasos cervicais. O músculo diafragma juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico, foi cuidadosamente retirado como o método descrito por BÜLBRING (1946) para ratos, modificado para camundongo, e colocado em cuba contendo 5,0 ml de solução Tyrode e, em seguida, presa, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos foi feito através de transdutor isométrico Load Bell BG 10GM, acoplado a um fisiógrafo Gold Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5g/cm por meio de um fio preso a porção tendinosa ligado ao transdutor isométrico sendo a estimulação indireta, com pulsos supramaximais, gerados por estimuladores S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 HZ de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Ao término do período de incubação foram injetados o veneno total ou crotoxina. Para cada experimento foram utilizados 3 a 6 animais.

Na preparação de camundongo, as concentrações de veneno e crotoxina usadas foram 1, 5, 10 e 20 (µg/ml).

3.12. Medida da atividade neurotóxica em músculo *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de GINSBORG & WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico, e após o isolamento

da preparação, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição de KCl (20,1 mM) e ACh (55 a 165 µM e 110 a 220 µM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. O registro das contraturas para K⁺ e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição do veneno ou crotoxina) e no final do experimento. Para cada experimento foram utilizados 3 a 4 animais

Na preparação de ave, as concentrações de veneno e crotoxina usadas foram 0,04, 0,2, 1, 5 e 25 (µg/ml).

3.13. Análise estatística

A análise estatística foi feita através do teste t-student e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cromatografia de exclusão molecular do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* em coluna Superdex G 75

Aproximadamente 50 mg do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* foi aplicado em uma coluna Superdex G-75 e eluída com bicarbonato de amônia 0,2 M. Antes da aplicação a amostra foi dissolvida em tampão bicarbonato de amônia 1 M pH 7,8 e clarificada por meio de centrifugação. Na Fig. 5 mostramos o perfil cromatográfico obtido para o veneno total de *Crotalus durissus cascavella*. Esse fracionamento mostrou a presença de dois picos principais (I e III). As atividades farmacológicas das frações I e III foram avaliadas e a fração I apresenta atividade de convulxina caracterizada pelas convulsões (PRADO-FRANCESCHI et al., 1981) e a fração III apresenta atividade de crotoxina caracterizada pela parada respiratória por paralisia flácida do diafragma (VITAL BRAZIL, 1966). A crotoxina representa a maior porcentagem do veneno total, aproximadamente 58%.

4.2. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

O veneno de *C. d. cascavella* e o veneno de *C. d. terrificus*, aproximadamente 20 mg foram aplicados em uma coluna Protein pack 300SW eluída com tampão bicarbonato de amônia 0,2 M, pH 7,9, a um fluxo de 0,1 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. O perfil cromatográfico do veneno total de *C. d. cascavella* em HPLC de exclusão molecular é mostrado na figura 6a e foi similar ao obtido em LC 650 na coluna Superdex G75. As frações I, II, III e IV correspondem respectivamente a convulxina, giroxina, crotoxina e intercro.

O perfil cromatográfico obtido para o veneno de *Crotalus durissus terrificus* é mostrado na figura 6b e foi compatível com resultados já publicados (LANDUCCI et al., 1994). Os perfis cromatográficos obtidos com veneno de *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus* são similares. No entanto, o último possui a crotamina como uma de suas principais frações, a qual é praticamente ausente no veneno de *C. d. cascavella*. Por outro lado, a fração convulxina

apresenta aproximadamente o dobro da massa no veneno de *C. d. cascavella*, quando comparada à massa da convulxina no veneno de *C. d. terrificus* (Fig. 5 e 6).

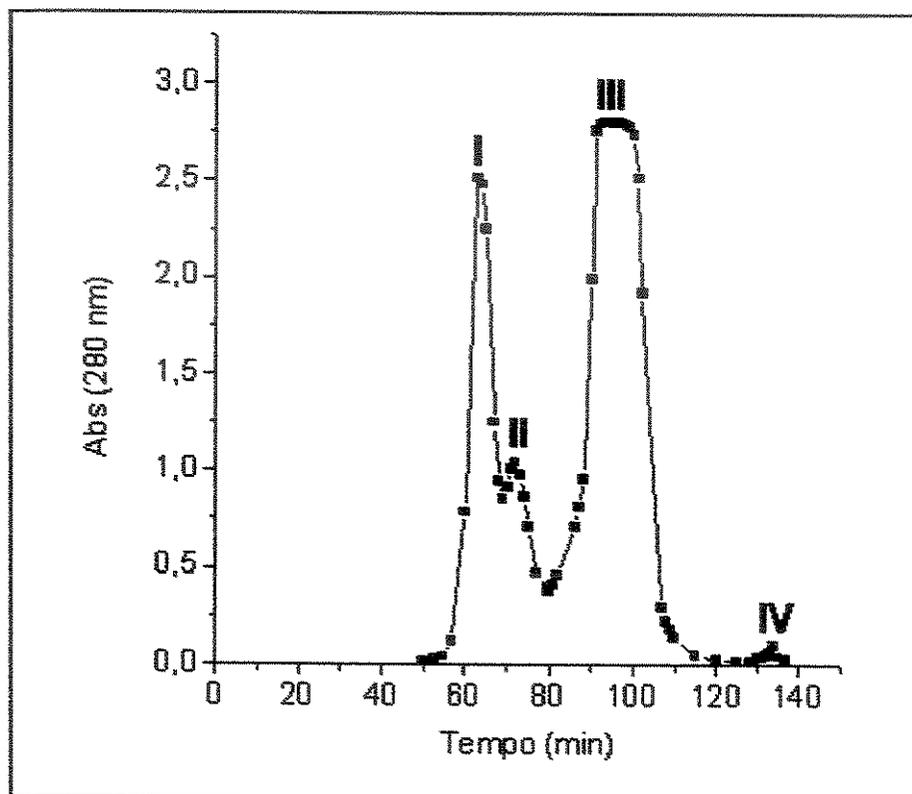


Fig. 5: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G-75 em LC 650 do veneno total de *Crotalus durissus cascavella*. Os picos I, II, III e IV correspondem respectivamente as frações: convulxina, giroxina, crotoxina e inter-cro. Notar a ausência da fração crotamina neste cromatograma.

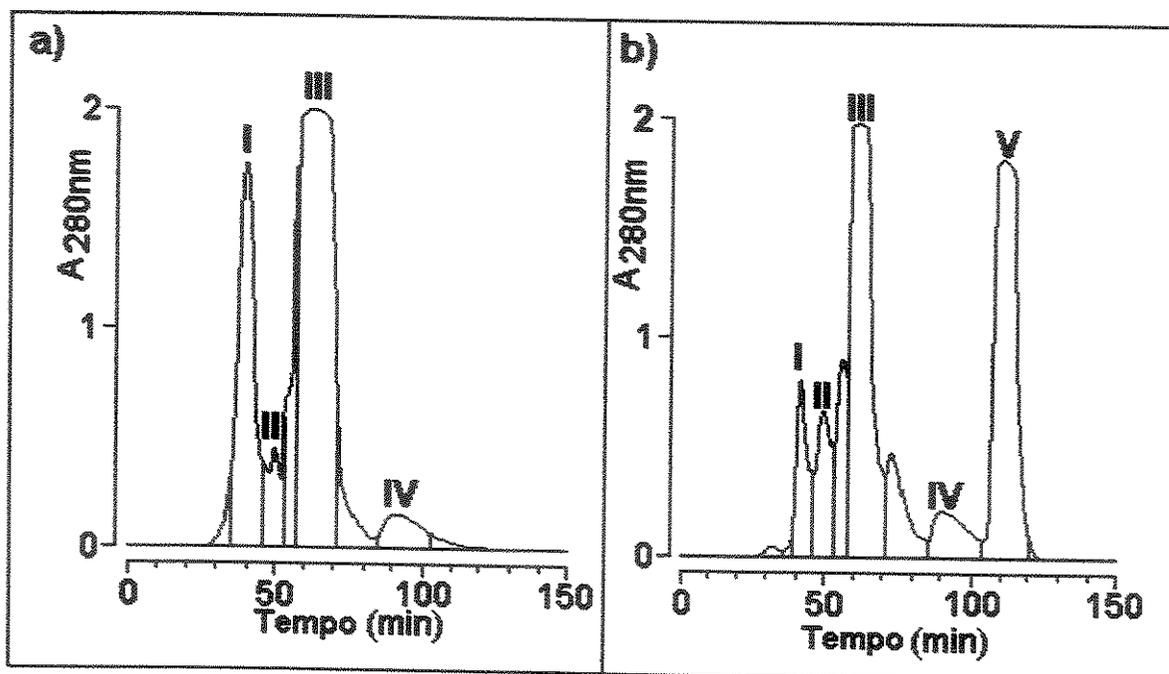


Fig. 6: Cromatografia de exclusão molecular em HPLC em coluna Protein pack SW300 do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* (6a) e do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (6b). Os picos I, II, III, IV e V correspondem respectivamente as frações: convulxina, giroxina, crotoxina, inter-cro e crotamina.

4.3. Cromatografia da fração crotoxina do veneno de *C. d. cascavella* em HPLC de fase reversa

Utilizando-se uma coluna C-18 μ -Bondapak em sistema de HPLC, aproximadamente 10 mg de crotoxina foram dissolvidas em 250 μ L de TFA (Solvente A) e clarificada por meio de centrifugação. A eluição das quatro frações de crotapotina (F2, F3, F4, F5) e uma fração de fosfolipase A₂ (F6) da crotoxina de *C. d. cascavella* foi realizada usando-se um gradiente linear de concentração de solvente B (acetonitrila 66%) em solvente A (TFA 0,1%) (Fig. 7a). A fração F6 de fosfolipase A₂ representa a maior porcentagem dessa crotoxina, aproximadamente 50%, enquanto que entre as isoformas de crotapotina, a fração F3 representa aquela de maior porcentagem. Portanto, na crotoxina obtida do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* foram detectadas quatro isoformas de crotapotina (F2, F3, F4 e F5) e uma fração de fosfolipase A₂ (F6). A fração crotapotina F3 de *C. d. cascavella* eluiu a 36% de solvente B e a fração PLA₂ F6 eluiu a 53% de B. Na crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, ao contrário, aparecem duas principais crotapotinas (CdtF5 e CdtF7) e três principais fosfolipases A₂ (CdtF15, CdtF16 e CdtF17) (Fig. 7b). As frações Cdt F5 e F7 eluíram a 45 e 47,5% de B, respectivamente, e as frações Cdt F15, F16 e F17 eluíram a 54, 56 e 57% de B, respectivamente.

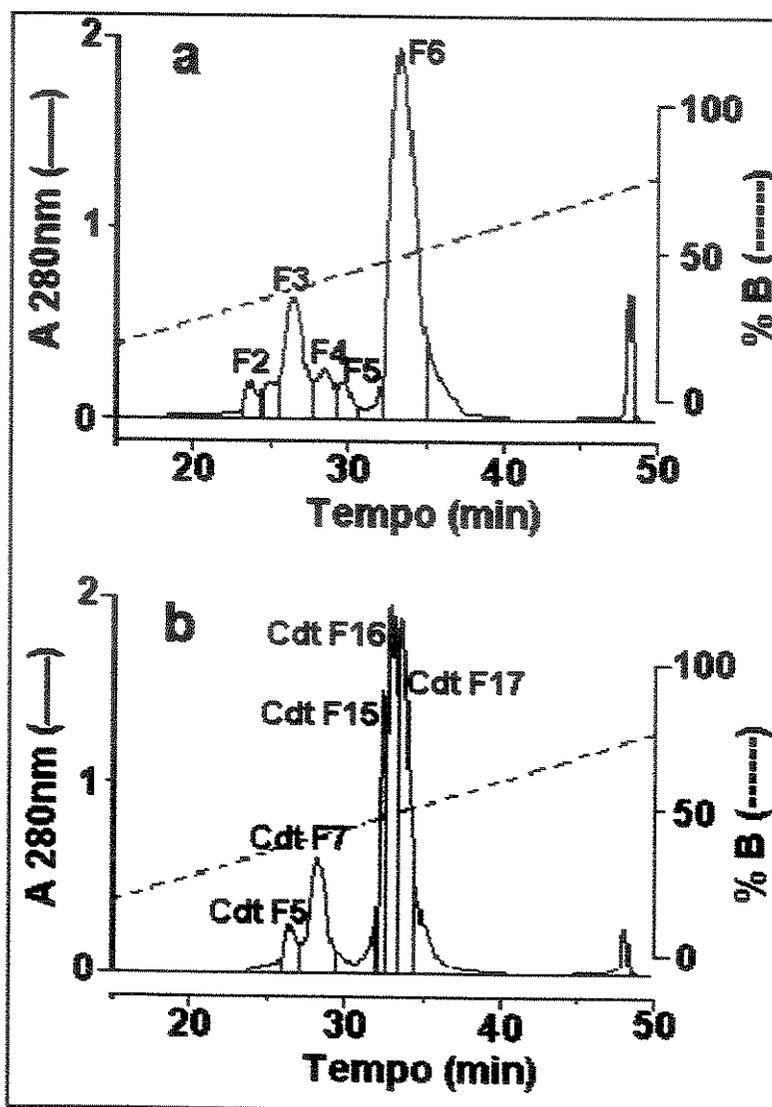


Fig. 7: Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa em coluna C-18 μ -Bondapak da crotoxina (III) de *Crotalus durissus cascavella* (a) e de *Crotalus durissus terrificus* (b). Em (a) F2, F3, F4 e F5 correspondem as isoformas de crotopotina e F6 corresponde a fosfolipase A₂. Em (b) Cdt F5 e Cdt F7 correspondem as isoformas de crotopotina e Cdt F15, Cdt F16 e Cdt F17 correspondem as isoformas de fosfolipase A₂.

4.4. Eletroforese em PAGE-SDS e PAGE-SDS-Tricina

A crotoxina e suas subunidades crotapotina e fosfolipase A₂ foram submetidas a uma análise em PAGE-SDS e PAGE-SDS-Tricina. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). Na Fig. 8 são mostrados os perfis de massa molecular em PAGE-SDS a 12,5% do veneno total de *C. d. cascavella* e de suas frações crotoxina (III) e fosfolipase A₂ (F6). As pistas eletroforéticas correspondem respectivamente: 1- fosfolipase A₂ reduzida com DTT (ditiotretitol), 2- fosfolipase A₂ sem redução, 3- crotoxina, 4- veneno total e 5- marcadores de massa molecular.

Na Fig. 9 mostramos a eletroforese em PAGE-SDS-Tricina do veneno total de *C. d. cascavella* e de suas frações crotoxina (III), crotapotinas (F3 e F4) e fosfolipase A₂ (F6). As pistas eletroforéticas correspondem respectivamente: 1- veneno total, 2- crotoxina, 3- crotapotina (F3), 4- crotapotina (F4), 5- fosfolipase A₂ reduzida com DTT e 6- marcadores de massa molecular.

A massa molecular estimada para PLA₂ de *C. d. cascavella* foi de 15 kDa, enquanto que para as principais isoformas de crotapotina F3 e F4 estimamos uma massa molecular de 9 kDa (Fig. 8 e 9).

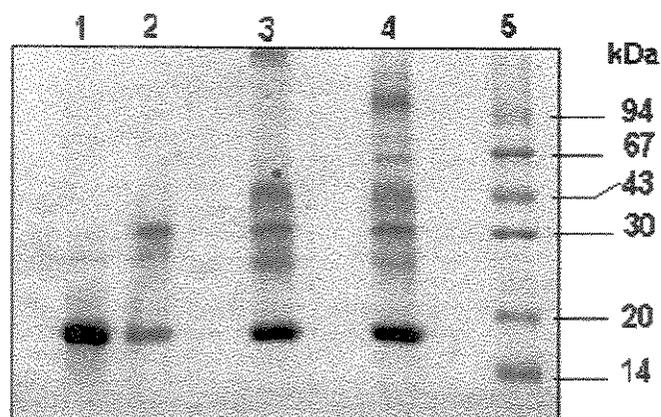


Fig. 8: Eletroforese em PAGE-SDS a 12,5% do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* e de suas frações crotoxina (III) e fosfolipase A₂ (F6). As pistas eletroforéticas correspondem respectivamente: 1- fosfolipase A₂ reduzida com DTT (ditiotreitól), 2- fosfolipase A₂ sem redução, 3- crotoxina, 4- veneno total e 5- marcadores de massa molecular.

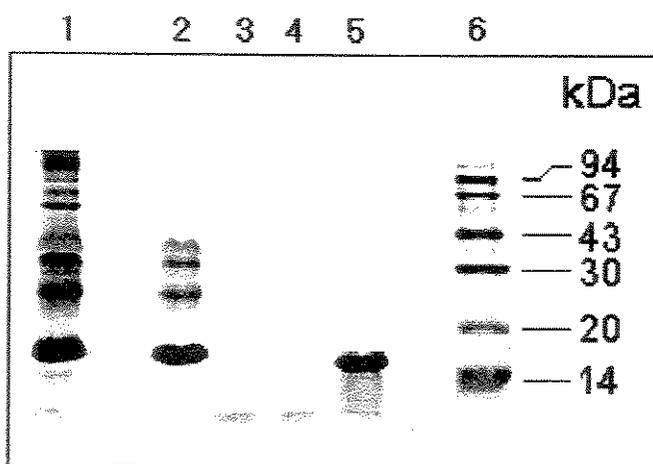


Fig. 9: Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina do veneno total de *Crotalus durissus cascavella* e de suas frações crotoxina, crotopotinas (F3 e F4) e fosfolipase A₂ (F6). As pistas eletroforéticas correspondem respectivamente: 1- veneno total, 2- crotoxina, 3- crotopotina (F3), 4- crotopotina (F4), 5- fosfolipase A₂ reduzida com DTT e 6- marcadores de massa molecular.

4.5. Análise de Aminoácidos

A análise de aminoácidos mostrada na Tab. 4 mostrou um alto conteúdo de aminoácidos básicos (Lys, Arg) e a presença de 14,5% de $\frac{1}{2}$ cisteínas na PLA₂ de *C. d. cascavella*, indicando a presença de grande número de pontes dissulfeto. As crotapotinas F3 e F4 diferem em seu conteúdo de Glx, Gly, Tyr, Met, and Pro, com F3 sendo fracamente menos hidrofóbica do que F4. A fração crotapotina F4 apresenta uma porcentagem maior de aminoácidos hidrofóbicos do que a F3.

Tab. 4: Composição de Aminoácidos das frações fosfolipase A₂ (F6), crotapotina (F3) e crotapotina (F4), isoladas a partir da crototoxina de *Crotalus durissus cascavella*. Os valores são expressos como porcentagem de resíduos por mol.

Aminoácidos	PLA ₂	crtp (F3)	crtp (F4)
Asx	7,05	12,30	11,80
Glx	8,36	17,01	14,60
Ser	4,50	5,46	5,11
His	1,59	1,11	1,05
Gly	7,23	9,91	9,43
Thr	5,65	4,11	3,91
Arg	7,62	2,36	2,16
Ala	4,41	6,23	5,69
Tyr	8,11	3,79	4,55
Met	2,22	1,64	1,29
Val	2,63	0,97	1,37
Phe	4,97	3,46	3,26
Ile	4,25	2,99	2,84
Leu	5,10	1,28	1,10
Lys	6,93	2,52	2,39
Pro	4,71	5,36	6,90
$\frac{1}{2}$ Cys	14,41	19,40	22,10
Total (%)	100	100	100

4.6. Estudos Cinéticos

A atividade enzimática da PLA₂ de *C. d. cascavella* foi examinada sob diferentes condições usando o substrato sintético cromogênico 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid (HOLZER & MACKESSY, 1996). Na Fig. 10 mostramos um ensaio padrão em que a atividade fosfolipásica foi determinada para PLA₂, crotoxina e veneno total de *C. d. cascavella* em nmoles/min. Nesse ensaio observamos que a atividade enzimática da PLA₂ isolada foi significativamente maior do que a atividade medida para crotoxina e veneno total.

4.6.1. Comportamento cinético

O efeito da concentração de substrato na velocidade de hidrólise da enzima foi estudado. Os resultados obtidos pela incubação da PLA₂ isolada, PLA₂ e crotapotina (em uma razão de 1:1) e PLA₂ e heparina são mostrados na Fig. 11. Em todos os casos, sob as condições experimentais usadas, a enzima PLA₂ mostrou um comportamento alostérico, principalmente em baixas concentrações de substrato. Essa resposta alostérica foi vista principalmente quando a crotapotina foi incubada com a PLA₂. Crotapotina e heparina atuaram como efetores alostéricos, com a crotapotina exibindo uma intensidade de ação significativamente maior.

4.6.2. Efeito de íons metálicos

Íons cálcio são requeridos para atividade da PLA₂ (BREITHAUPT, 1976). A escolha dos metais utilizados nesse ensaio foi baseada na literatura. A influência de outros cátions divalentes como Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ (10mM) foi estudada na presença de uma concentração sub ótima de CaCl₂ (1mM) e na ausência de CaCl₂. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8, utilizando tampões: Tris-HCl (10mM), contendo os íons Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺ (10 mM), NaCl (100mM), com concentração de CaCl₂ subótimas (1mM) ou com ausência de CaCl₂. O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.

Nessas condições na presença de Mg²⁺ e Mn²⁺ a enzima mostrou alta atividade. No entanto, na ausência completa de Ca²⁺ a enzima mostrou somente baixa atividade, isso confirma o requerimento exclusivo do íon Ca²⁺ na atividade enzimática da PLA₂ (Fig. 12).

4.6.3. Efeito inibitório da crotapotina

Esse ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8, incubando PLA₂ e crotapotina por 30 minutos a 37°C e depois medindo a atividade enzimática residual.

A crotapotina inibiu a atividade da PLA₂ de maneira concentração-dependente exibindo uma atividade máxima na concentração de 2µg/µl; não foi visto inibição completa aumentando-se a concentração de crotapotina (Fig. 13).

4.6.4. Efeito do pH

O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8 e os tampões utilizados na concentração de 10 mM foram: Citrato de sódio (pH 4,0-7,5), Tris (pH 7,8-8,8), Glicina (pH9,0-10,0). O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.

O efeito do pH na atividade da PLA₂ foi testado em uma escala de pH variando de pH 4,0 a 10,0. A atividade máxima da enzima foi observada entre os valores de pH 7,5-8,5 (Fig. 14).

4.6.5. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na velocidade inicial de hidrólise do substrato foi medida, dentro de uma variação de 25 a 45°C, e a velocidade máxima foi observada entre 35 e 40°C (Fig. 15).

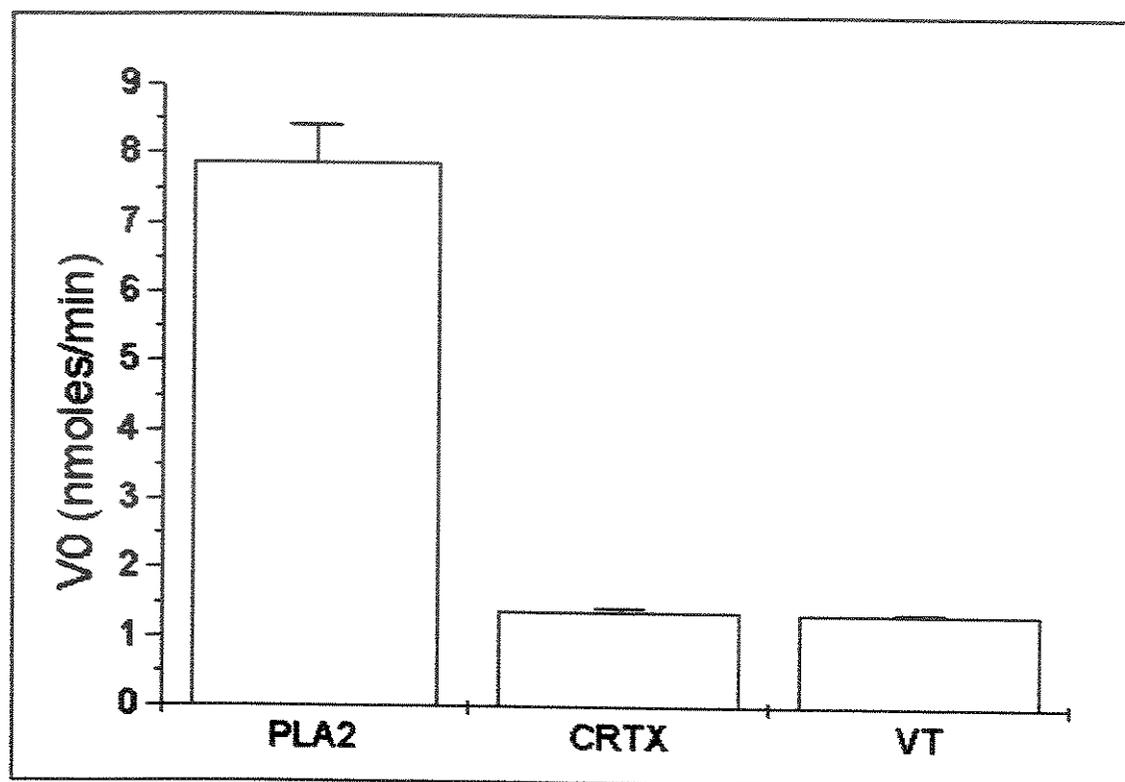


Fig. 10: Atividade fosfolipásica em nmoles/min da PLA₂, crotoxina (CRTX) e veneno total (VT) de *C. d. cascavella*.

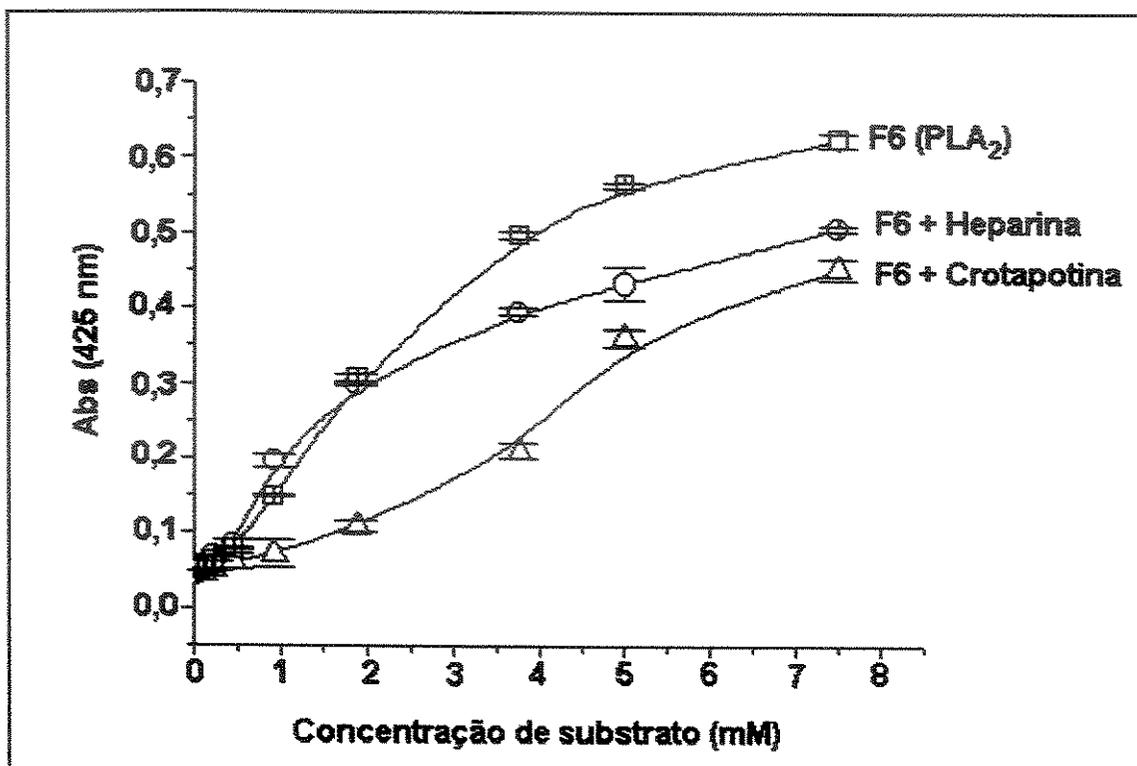


Fig. 11: Efeito da concentração de substrato na cinética da PLA₂ (F6) de *C. d. cascavella*. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8 variando-se a concentração de substrato na ausência e na presença de crotopotina e heparina.

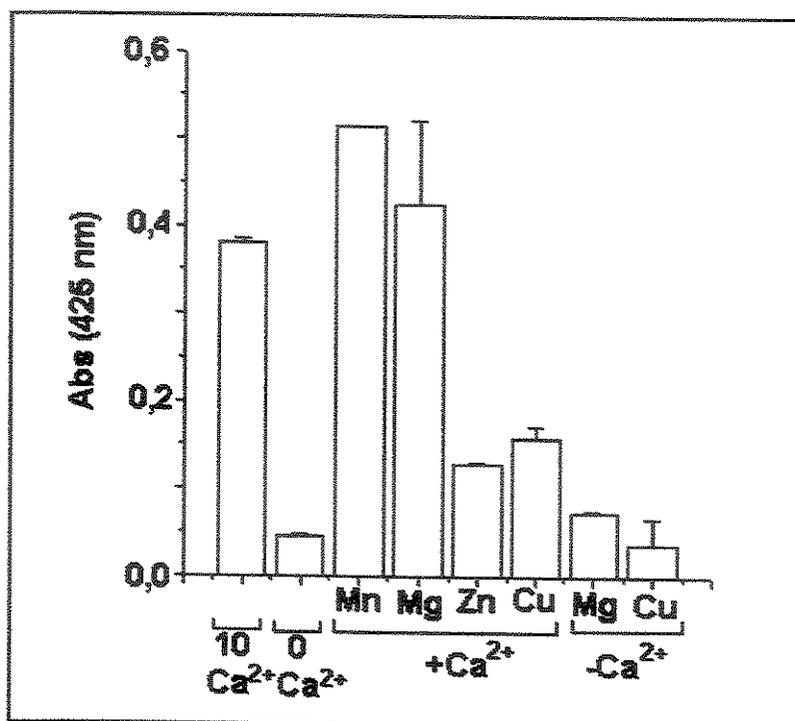


Fig. 12: Influência de íons na atividade da PLA₂ de *C. d. cascavella*. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8, utilizando tampões: Tris-HCl (10mM), contendo os íons Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺ (10 mM), NaCl (100mM), com concentração de CaCl₂ subótima (1mM) ou com ausência de CaCl₂. O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.

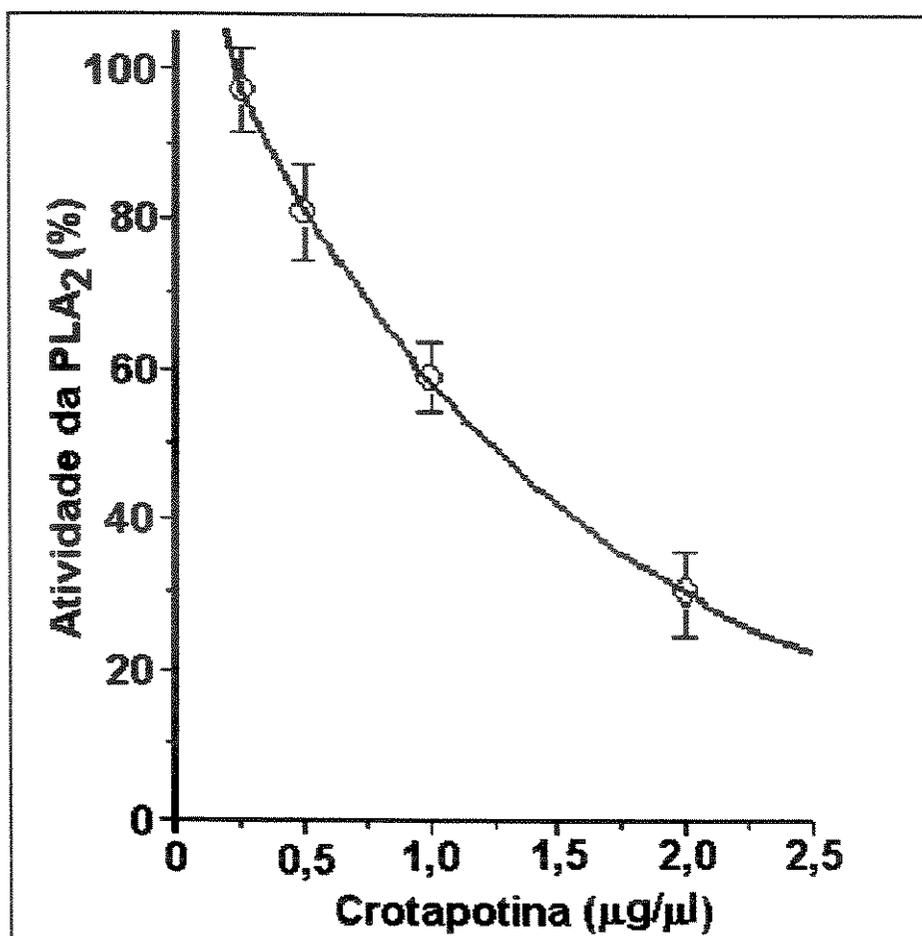


Fig. 13: Efeito inibitório da crotapotina sobre a atividade da PLA₂ de *C. d. cascavella*. Esse ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8, incubando PLA₂ e crotapotina por 30 minutos a 37°C e depois medindo a atividade enzimática residual

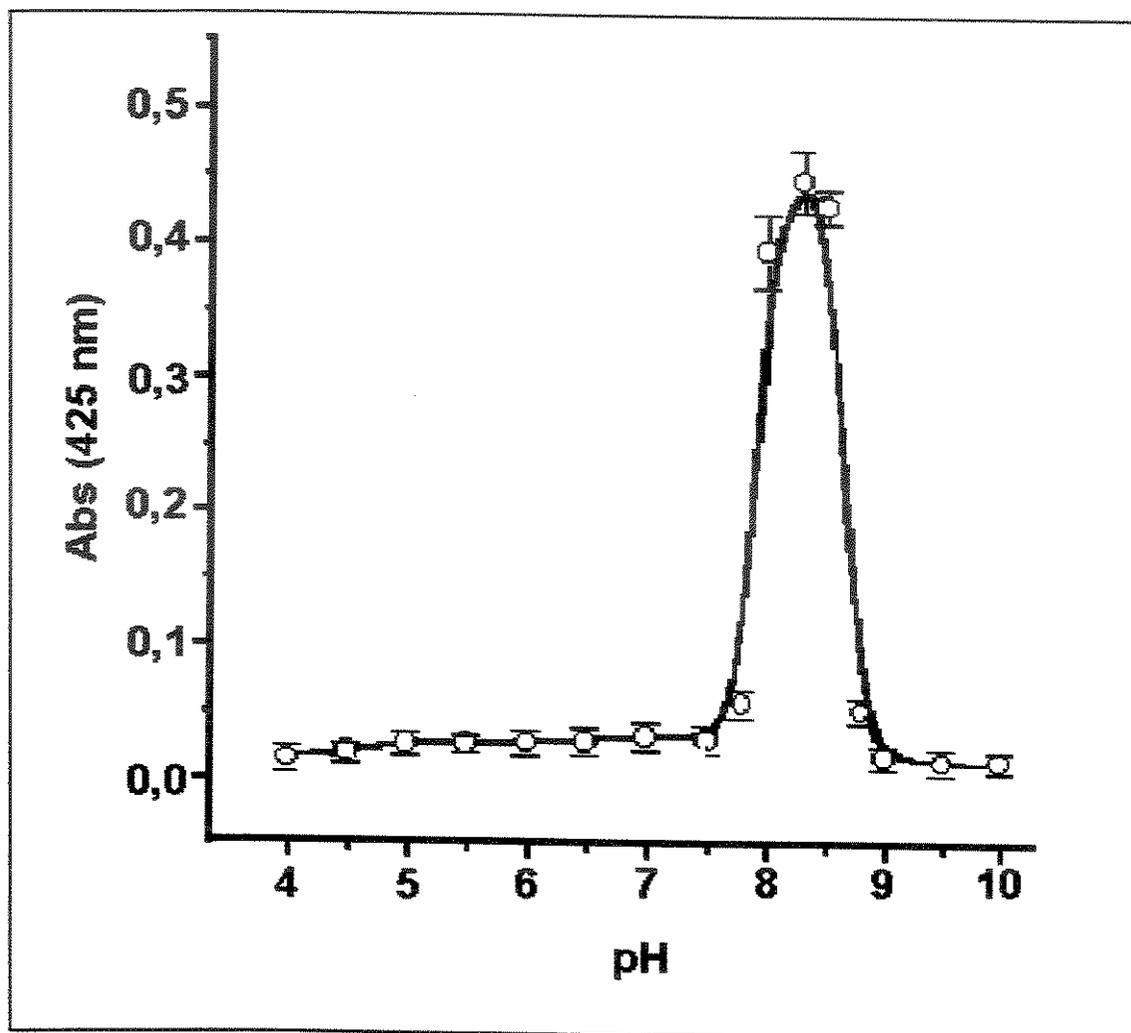


Fig. 14: Efeito da variação de pH sobre a atividade da PLA₂ de *C. d. cascavella*. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8 e os tampões utilizados na concentração de 10 mM, foram: Citrato de sódio (pH 4,0-7,5), Tris (pH 7,8-8,8), Glicina (pH 9,0-10,0). O tempo de reação foi de 20 minutos a 37°C.

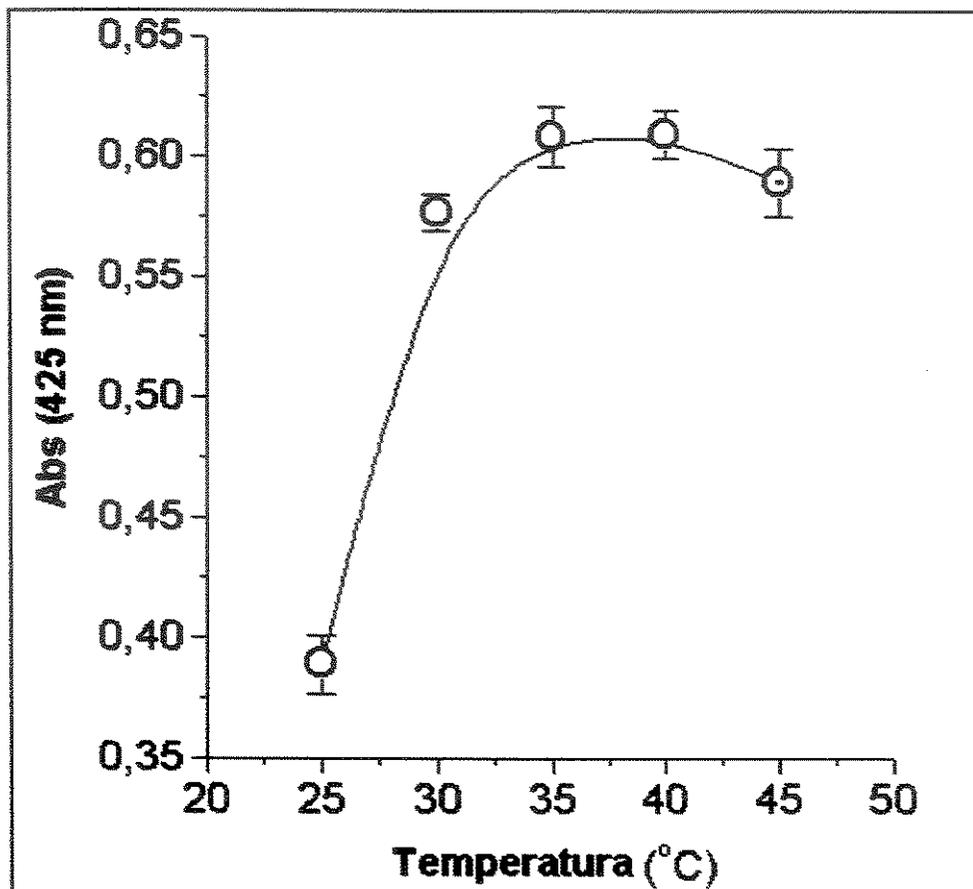


Fig. 15: Efeito da variação de temperatura sobre a atividade da PLA₂ de *C. d. cascavella*. O ensaio foi realizado conforme descrito no método 3.8. A temperatura, variada de 25-45°C, foi mantida por 20 minutos e em seguida feita a leitura a 425nm.

4.7. Estudo miográfico das amostras de crotoxina e veneno bruto de *C. d. cascavella*

4.7.1. Estimulação indireta em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Nos experimentos realizados para se determinar o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil, foram utilizadas doses de 0,04, 0,2, 1, 5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno e para crotoxina. Todas as doses de veneno e crotoxina utilizadas determinaram bloqueio de 50% das respostas musculares, com exceção da dose de 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Nos experimentos usando o veneno total na dose de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 50% de bloqueio foi atingido em média aos $66 \pm 3,2$ min ($n=3$) e na a dose de 25 $\mu\text{g/ml}$ 50% de bloqueio foi atingido aos $23,3 \pm 5,8$ min ($n=3$). Nos experimentos usando a crotoxina na dose de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ 50% de bloqueio foi atingido aos $72,2 \pm 5,3$ min ($n=3$) e na dose de 25 $\mu\text{g/ml}$ 50% de bloqueio foi atingido aos $21,5 \pm 2,1$ min ($n=3$) (Tab. 5). O bloqueio foi dose-dependente. As doses de 0,2, 1, 5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ de veneno bruto utilizadas levaram a bloqueio total e irreversível das contrações musculares (Fig. 16). Nas figuras 17 e 18 são mostrados os perfis miográficos das preparações tratadas com o veneno total. As doses de 5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ de crotoxina levaram a bloqueio total e irreversível das contrações musculares (Fig. 19). Nas figuras 20 e 21 são mostrados os perfis miográficos das preparações tratadas com crotoxina. Repetidas lavagens nas preparações tratadas com veneno ou crotoxina não foram capazes de reverter o bloqueio. Nos experimentos controle, o registro das contrações permaneceu estável (93,9% de resposta durante 120 minutos em Krebs, $n=4$).

4.7.2. Respostas ao efeito contraturante da acetilcolina e do potássio

A incubação da preparação com o veneno bruto variou a resposta contraturante da acetilcolina e do potássio de aproximadamente 80 a 140% do controle para ambas. Essa variação foi independente da dose (Fig. 22).

A incubação da preparação com a crotoxina levou a uma variação da resposta contraturante a adição de potássio da ordem de 40 a 110% do controle aproximadamente, independente da dose. Com relação às respostas contraturantes da acetilcolina, elas

variaram de 60 a 110% aproximadamente do controle, independente da dose de crotoxina utilizada (Fig. 23). A variação nas respostas da acetilcolina e do KCl induzidas pela crotoxina e pelo veneno total não foram consideradas significativas por não haver nenhuma correlação com a dose de veneno e crotoxina utilizadas quando houve tal variação.

Nos experimentos controle, as respostas mantiveram-se estáveis, na ausência de veneno após 120 minutos de estimulação indireta; as respostas à ACh e KCl ficaram em média $105,4 \pm 7,3\%$ e $96,2 \pm 3,7\%$, respectivamente.

Tab. 5 – Tempo necessário para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho, incubado com o veneno e crotoxina de *C. d. cascavella*.

Veneno <i>C. d. cascavella</i>	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo para 50% de bloqueio (min)	n
Veneno total	0,04	-	3
	0,2	$66,6 \pm 3,2$	3
	1	$32,7 \pm 0,9$	3
	5	$26,9 \pm 1,4$	3
	25	$23,3 \pm 5,8$	3
Crotoxina	0,04	-	3
	0,2	$72,2 \pm 5,3$	3
	1	$33,8 \pm 3,9$	3
	5	$23,9 \pm 3,7$	4
	25	$21,5 \pm 2,1$	3

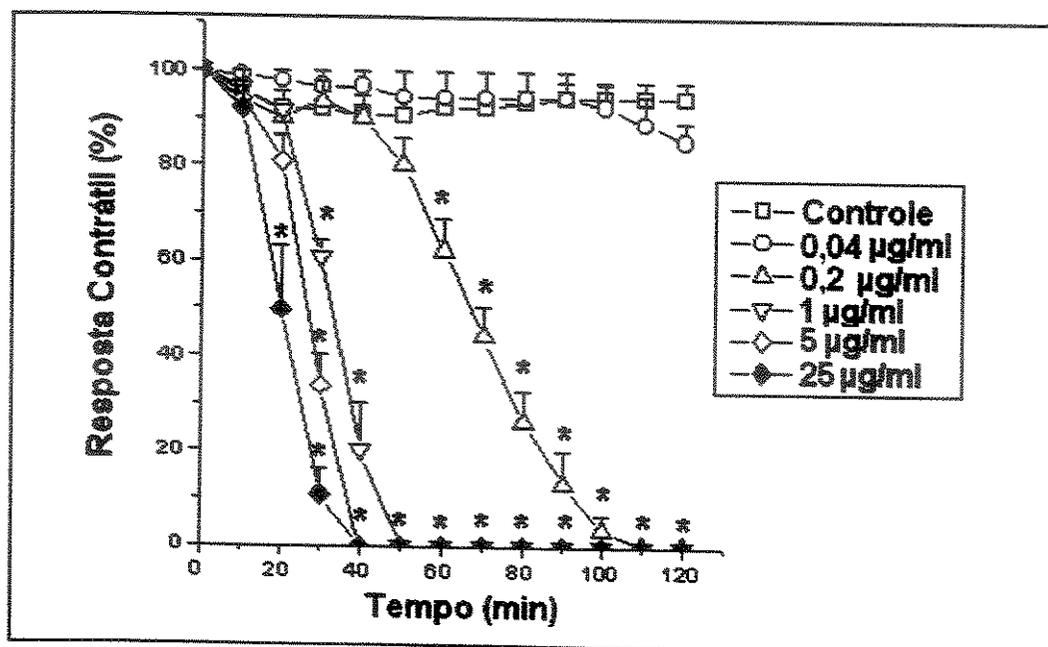


Fig. 16: Bloqueio neuromuscular em preparação *biventer cervicis* de pintainho induzido pelo veneno total de *C. d. cascavella*. Cada ponto representa a média de 3 experimentos \pm EPM.

* $p < 0,05$

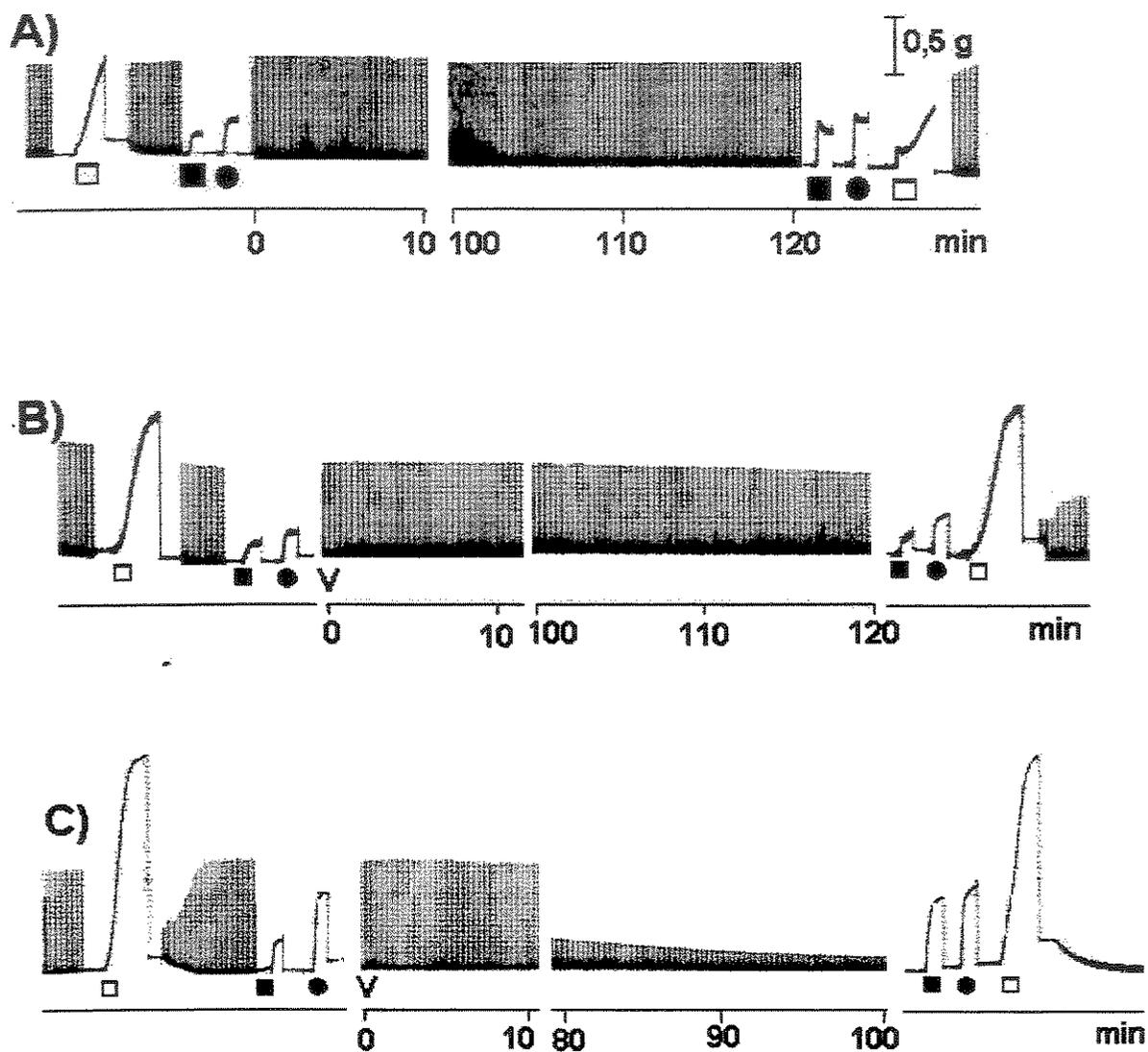


Fig. 17: Efeito do veneno de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em A) controle em Krebs, em B) e C) veneno nas doses de 0,04 e 0,2 µg/ml, respectivamente. Em V, adição do veneno. Resposta contraturante da ACh (■ 55 a 165 µM, ● 110 a 220 µM) e KCl (□ 20,1 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. A tensão usada nas preparações foi de 0,5 g.

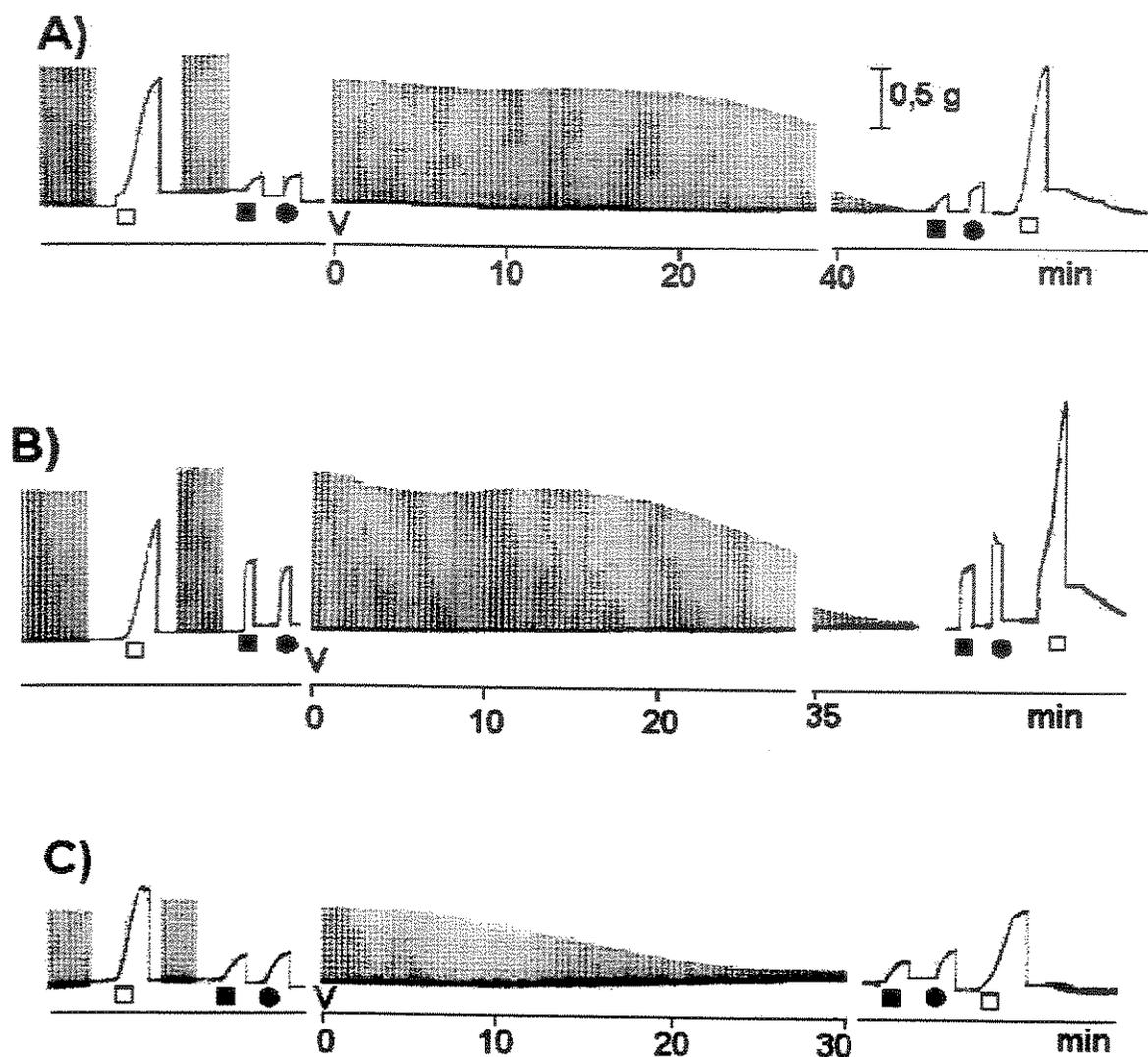


Fig. 18: Efeito do veneno de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em A), B) e C) veneno nas doses de 1, 5 e 25 µg/ml, respectivamente. Em V, adição do veneno. Resposta contraturante da ACh (■ 55 a 165 µM, ● 110 a 220 µM) e KCl (□ 20,1 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. A tensão usada nas preparações foi de 0,5 g.

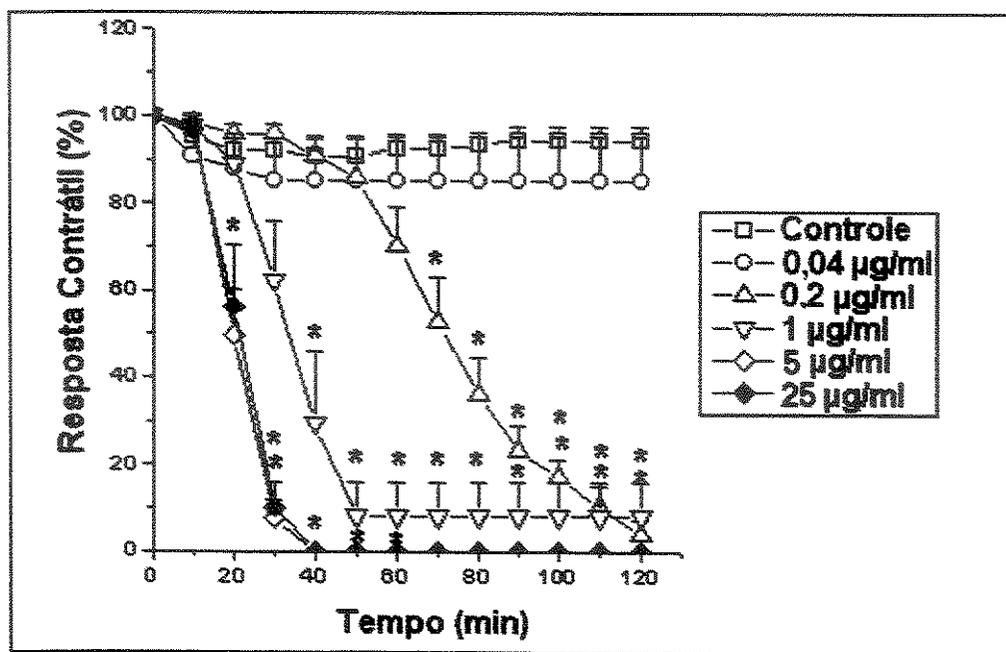


Fig. 19: Bloqueio neuromuscular em preparação *biventer cervicis* de pintainho induzido pela crotoxina de *C. d. cascavella*. Cada ponto representa a média de 3 a 4 experimentos \pm EPM.
* $p < 0,05$.

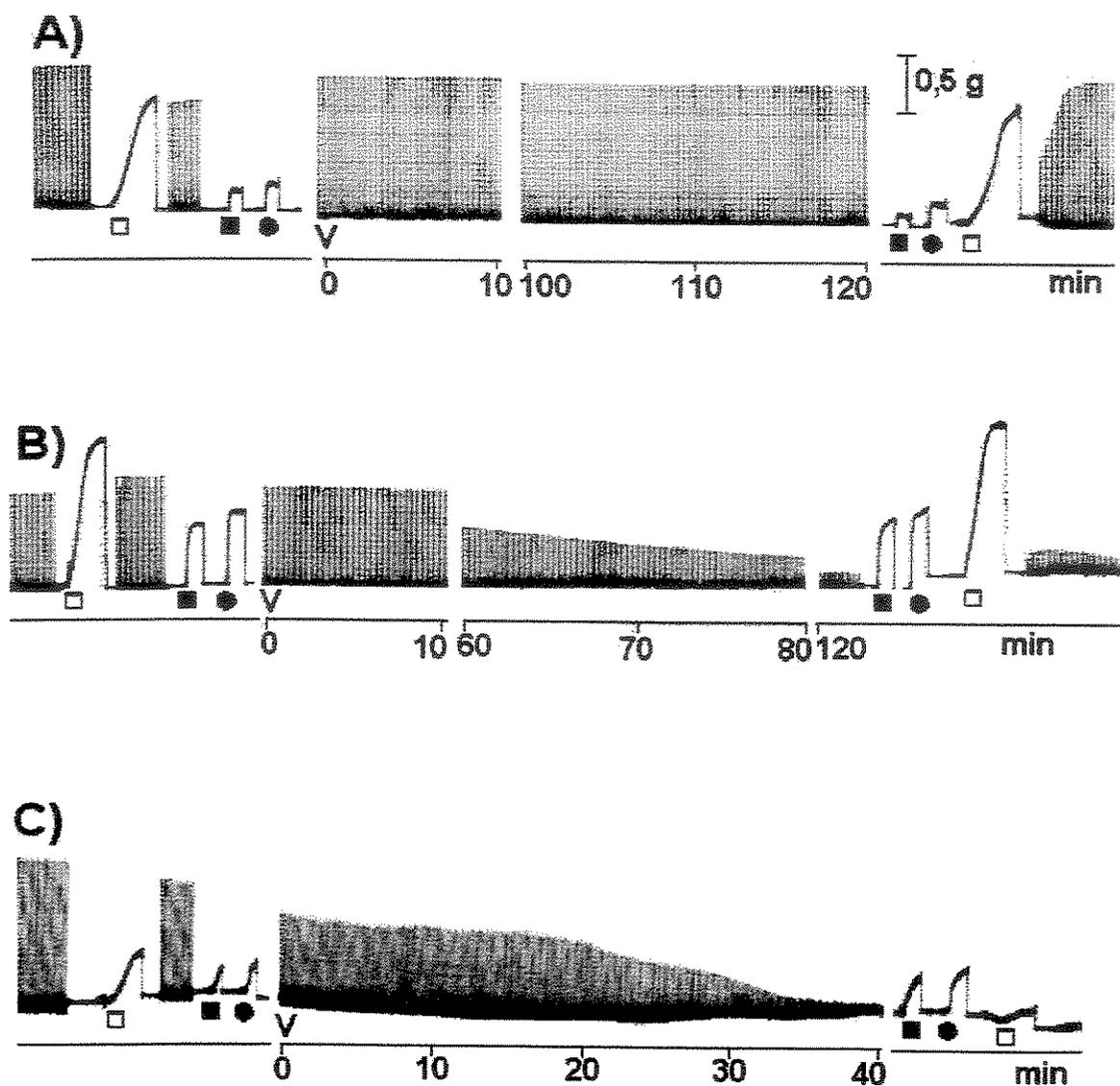


Fig. 20: Efeito da crotoxina do veneno de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em A), B) e C) crotoxina nas doses de 0,04, 0,2 e 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Em V, adição da crotoxina. Resposta contraturante da ACh (■ 55 a 165 μM , ● 110 a 220 μM) e KCl (□ 20,1 mM) foi obtida antes e depois da adição de crotoxina. A tensão usada nas preparações foi de 0,5 g.

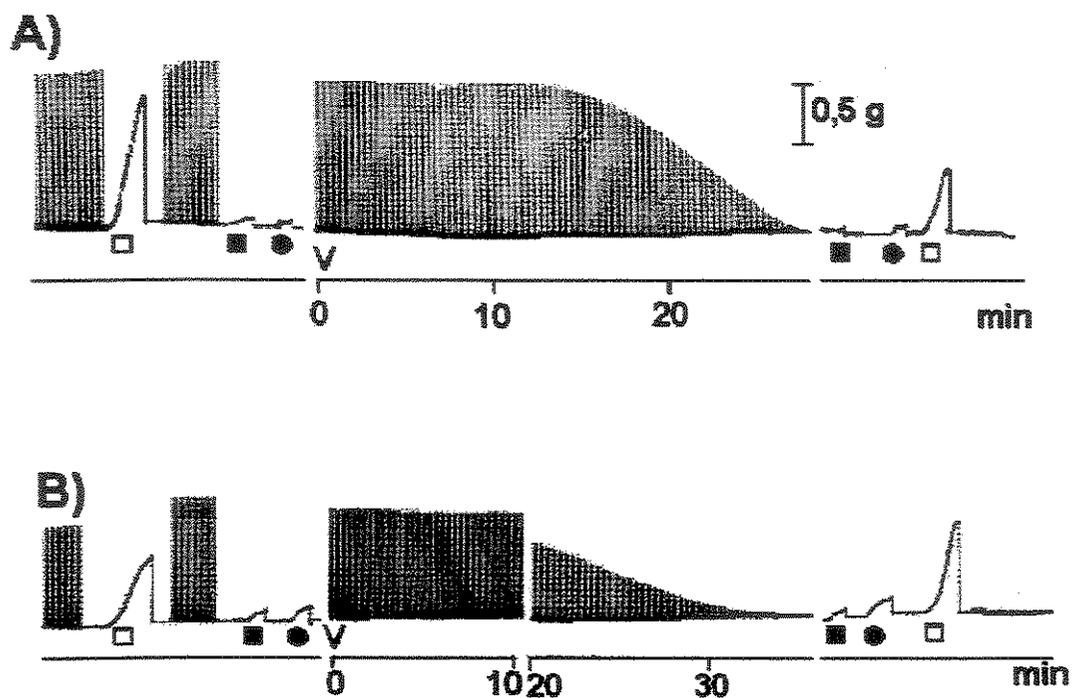


Fig. 21: Efeito da crotoxina do veneno de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz). Em A) e B) crotoxina nas doses de 5 e 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Em V, adição da crotoxina. Resposta contraturante da ACh (■ 55 a 165 μM , ● 110 a 220 μM) e KCl (□ 20,1 mM) foi obtida antes e depois da adição de crotoxina. A tensão usada nas preparações foi de 0,5 g.

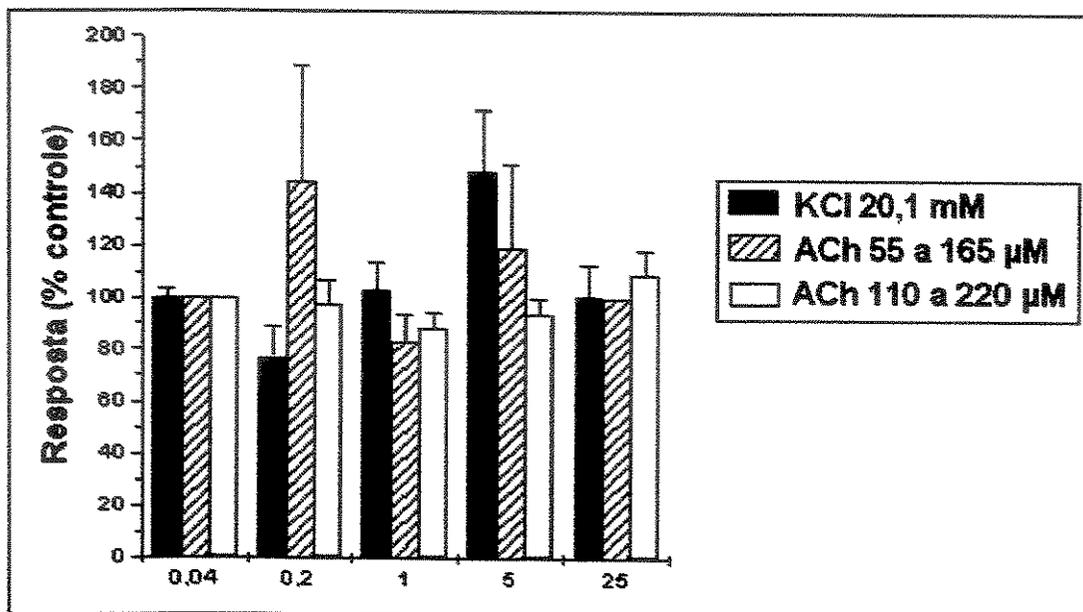


Fig. 22: Efeito do veneno total de *C. d. cascavella* sobre as respostas da preparação *biventer cervicis* de pintainho à acetilcolina (ACh) e potássio (KCl). As preparações foram expostas ao veneno, nas concentrações indicadas pelos números (μg/ml) colocados sob cada histograma. Cada ponto representa a média de 3 experimentos ± EPM.

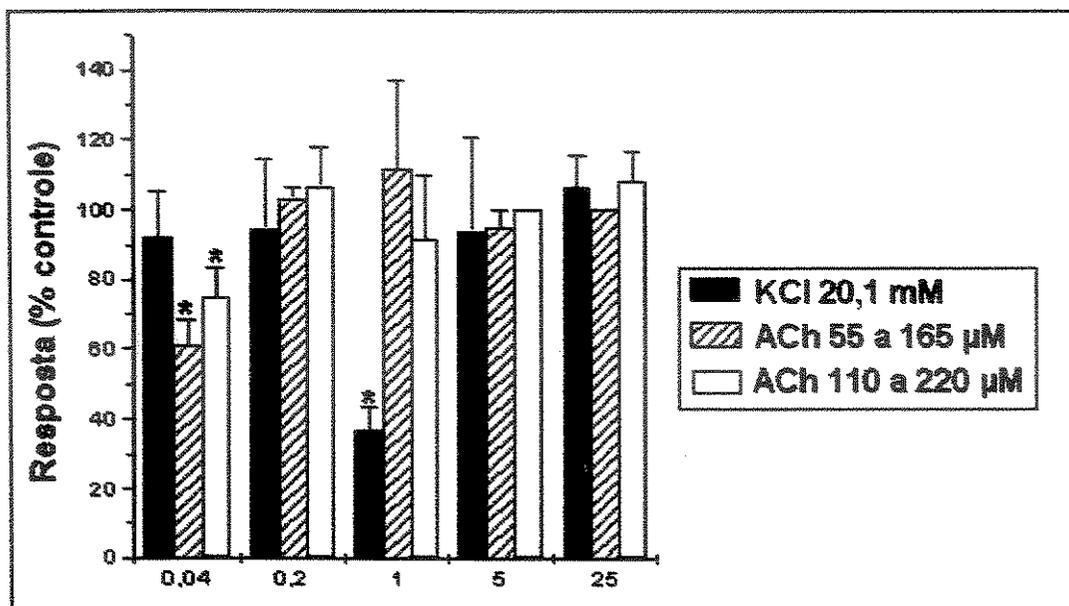


Fig. 23: Efeito da crotoxina de *C. d. cascavella* sobre as respostas da preparação *biventer cervicis* de pintainho à acetilcolina (ACh) e potássio (KCl). As preparações foram expostas a crotoxina, nas concentrações indicadas pelos números ($\mu\text{g/ml}$) colocados sob cada histograma. Cada ponto representa a média de 3 a 4 experimentos \pm EPM. * $p < 0,05$.

4.7.3. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

A preparação nervo músculo de camundongo mostrou-se menos sensível à ação bloqueadora neuromuscular tanto da crotoxina quanto do veneno total de *C. d. cascavella*, quando submetida a estímulo elétrico indireto. Nos experimentos realizados para se determinar o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil, foram utilizadas doses de 1, 5, 10, 20 e 40 µg/ml para o veneno total e doses de 1, 5, 10 e 20 µg/ml para a crotoxina de *C. d. cascavella* (Tab. 6). Nos experimentos usando o veneno total na dose de 10 µg/ml 50% de bloqueio foi atingido em média aos $37 \pm 1,5$ min (n=3) e na dose de 40 µg/ml 50% de bloqueio foi atingido aos $33,1 \pm 2,9$ min (n=5). Nos experimentos usando a crotoxina na dose de 1 µg/ml 50% de bloqueio foi atingido aos $52,6 \pm 4,5$ min (n=5) e na dose de 20 µg/ml 50% de bloqueio foi atingido aos $31,4 \pm 4,7$ min (n=3). O bloqueio foi dose dependente para a crotoxina (Tab. 6). As doses de 1 e 5 µg/ml de veneno total não determinaram bloqueio de 50% das respostas musculares, em um período de 120 minutos de incubação (Fig. 24). Na figura 25 são mostrados os perfis miográficos das preparações tratadas com veneno total.

A crotoxina de *C. d. cascavella* foi mais potente em bloquear a junção neuromuscular em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo do que o veneno total. A crotoxina, em todas as doses estudadas (1, 5, 10 e 20 µg/ml), determinou bloqueio de 50% das respostas musculares, em um período inferior a 120 minutos de incubação (Fig. 26). Na figura 27 são mostrados os perfis miográficos do controle em Tyrode e das preparações tratadas com crotoxina.

Repetidas lavagens nas preparações tratadas com veneno ou crotoxina não foram capazes de reverter o bloqueio. Nos experimentos controle, a resposta contrátil manteve-se estável (91% de resposta, n=4), durante 120 minutos, com incubação em Tyrode.

Tab. 6– Tempo necessário para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação nervo frênico de diafragma de camundongo, incubado com o veneno e crotoxina de *C. d. cascavella*.

Veneno <i>C. d. cascavella</i>	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo para 50% de bloqueio (min)	n
Veneno total	1	-	3
	5	-	3
	10	$37 \pm 1,5$	3
	20	$39,5 \pm 3,29$	3
	40	$33,18 \pm 2,95$	5
Crotoxina	1	$52,64 \pm 4,56$	5
	5	$36,68 \pm 4,11$	6
	10	$41,52 \pm 5,08$	4
	20	$31,43 \pm 4,78$	3

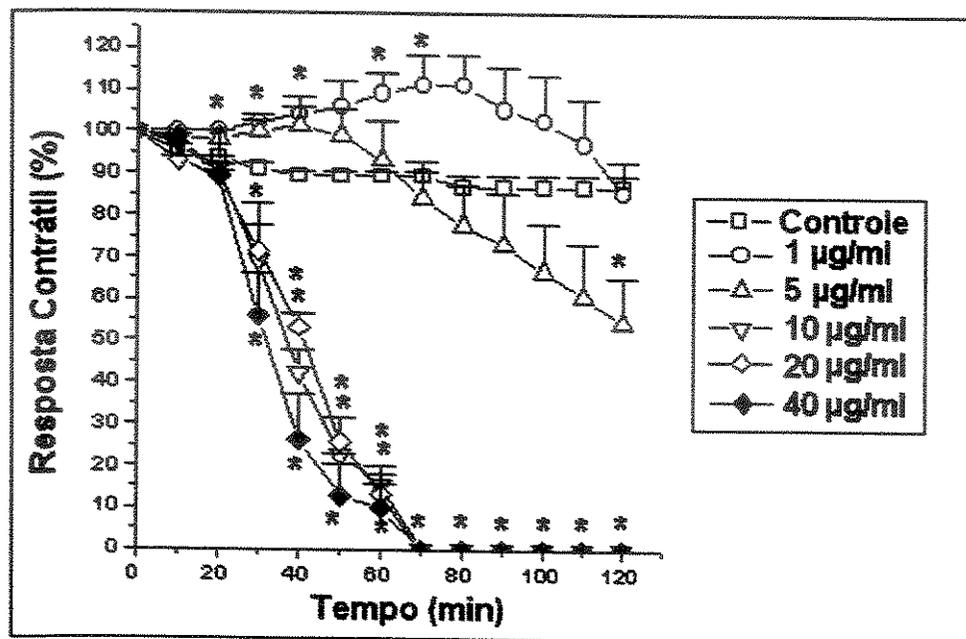


Fig. 24: Efeito do veneno total de *C. d. cascavella* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média \pm EPM de 3 a 5 experimentos. * $p < 0,05$.

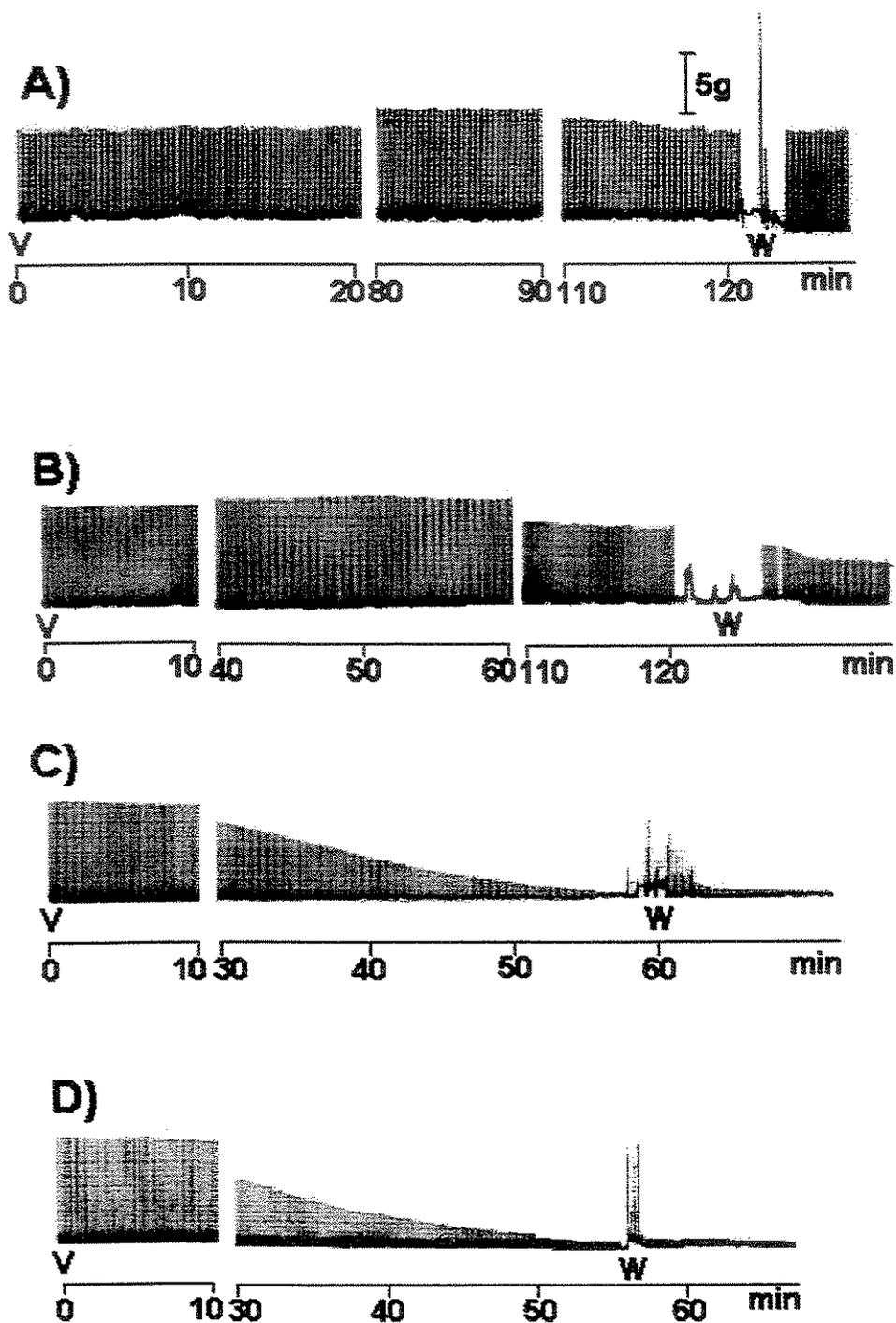


Fig. 25: Efeito do veneno de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta. Em A), B), C) e D) veneno total nas doses de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. A tensão usada nas preparações foi de 5g.

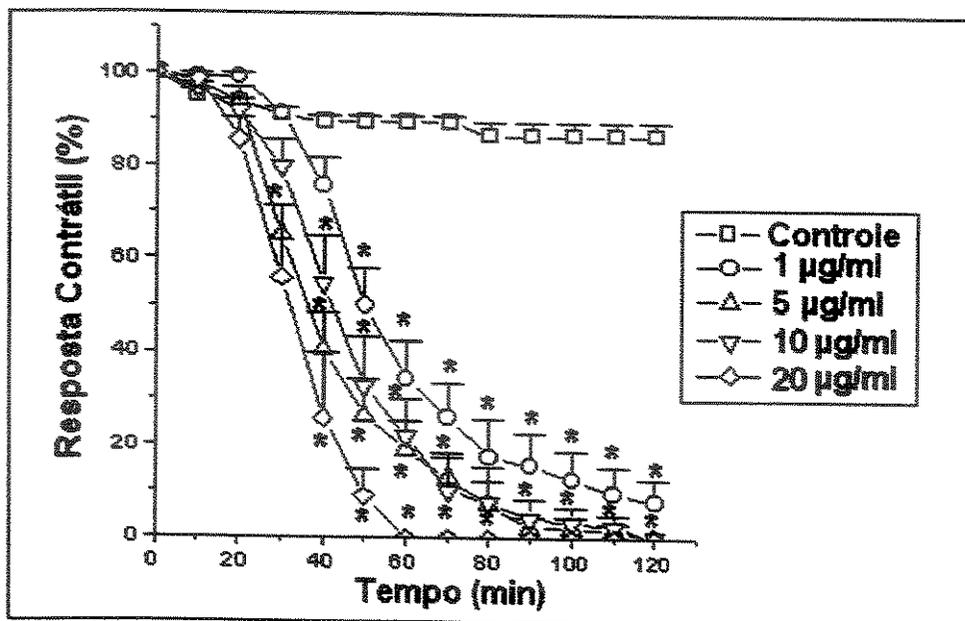


Fig. 26: Efeito da crotoxina de *C. d. cascavella* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média \pm EPM de 3 a 6 experimentos. * $p < 0,05$.

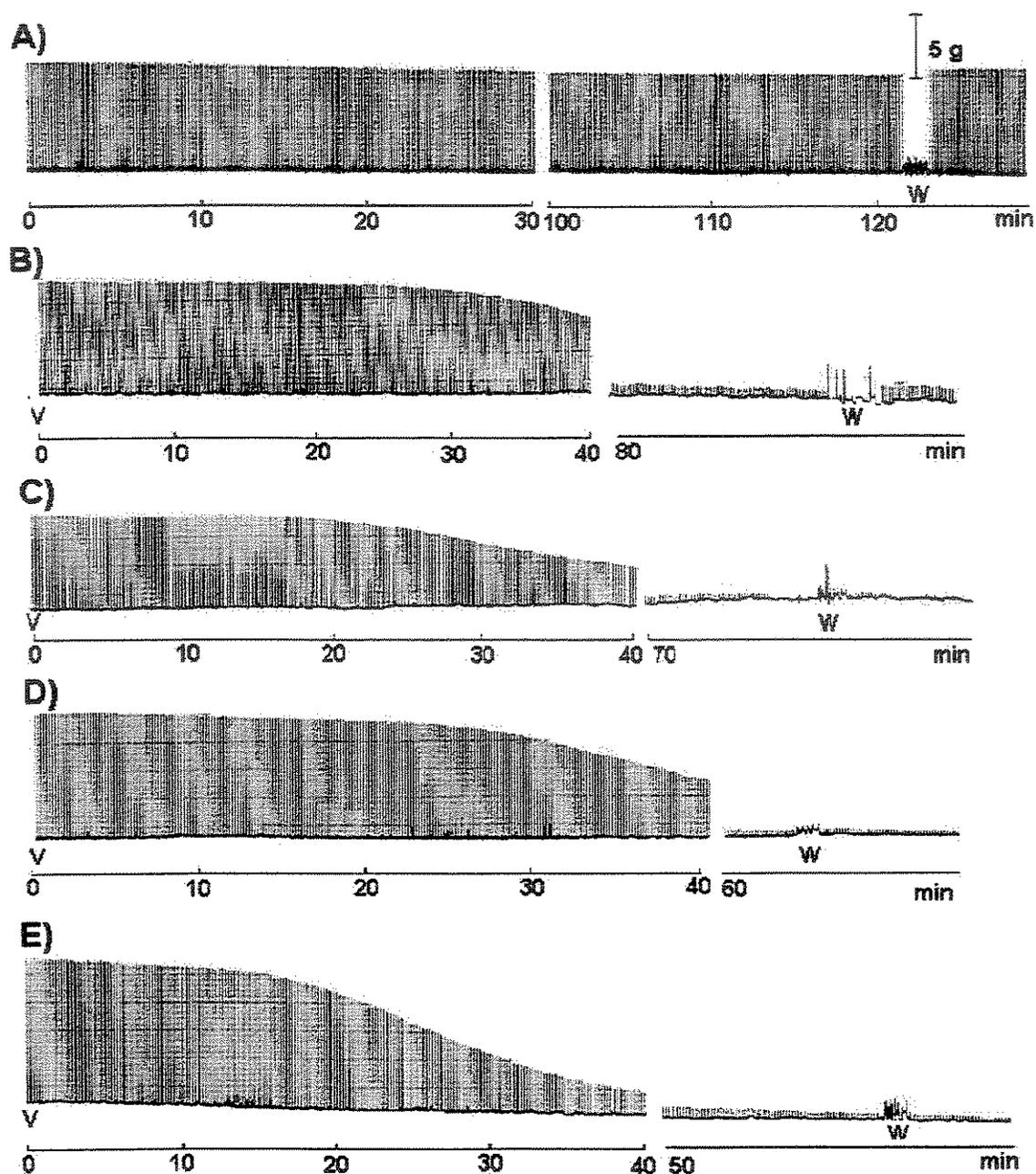


Fig. 27: Efeito da crotoxina de *C. d. cascavella*, sobre o perfil miográfico, da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta. Em A) controle em Tyrode, em B), C), D) e E) crotoxina nas doses de 1,5, 10 e 20 µg/ml. A tensão usada nas preparações foi de 5g.

5. DISCUSSÃO

A crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella* foi purificada em uma coluna Superdex G-75 e fracionada em HPLC de fase reversa, obtendo-se desta forma as subunidades crotapotina (F2, F3, F4 e F5) e fosfolipase A₂ (F6). Assim, conseguimos isolar em apenas dois passos cromatográficos a crotoxina e suas subunidades (Fig. 5 e 7). A crotoxina também pôde ser isolada em HPLC de exclusão molecular na coluna Protein pack SW 300 (Fig. 6). Os perfis cromatográficos do veneno total de *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus* foram comparados. FAURE & BON (1988) obtiveram as subunidades do complexo crotoxina de *C. d. terrificus* através de várias etapas cromatográficas: partindo de uma coluna convencional Sephadex G-75, indo para CM-celulose, e em seguida para HPLC de fase reversa. Portanto, no presente trabalho foi utilizado pela primeira vez uma metodologia capaz de com um menor número de etapas obter as quatro isoformas de crotapotina e uma de PLA₂, a partir do veneno total de *C. d. cascavella*.

O perfil cromatográfico de eluição do veneno total de *C. d. cascavella* mostrou ausência da fração crotamina, que se encontra presente no veneno de *C. d. terrificus*. A ausência de crotamina seria um forte indício da importância da crotoxina dentro do veneno de *C. d. cascavella*, sendo portanto, o componente principal responsável pelos efeitos farmacológicos. A falta de atividade crotamínica no veneno de *C. d. cascavella* foi também observada por SANTORO et. al. (1999). Desta forma, o estudo e compreensão da crotoxina de *C. d. cascavella* tanto do ponto de vista bioquímico como farmacológico é fortemente embasado e se justifica.

Os resultados da purificação da crotoxina de *C. d. cascavella* em HPLC de fase reversa indicaram a presença de quatro isoformas de crotapotina (F2, F3, F4 e F5) e apenas uma de PLA₂ (F6) (Fig. 7a). Portanto, o veneno de *C. d. cascavella* contém pelo menos quatro isoformas de crotoxina formadas por diferentes combinações das crotapotinas com a única isoforma de PLA₂. O veneno de *C. d. terrificus* mostra a presença de duas principais crotapotinas (Cdt F5 e F7) e três isoformas de PLA₂ (Cdt F15, F16 e F17) (Fig. 7b), sugerindo, desta forma, a presença de seis isoformas de crotoxina. FAURE & BON (1988) detectaram a presença de 8 isoformas de crotoxina no veneno de *C. d. terrificus* obtidas em um estado homogêneo pela associação das isoformas do componente A e B purificados. Apesar da grande similaridade funcional entre as crotoxinas de *C. d. cascavella* e de *C. d. terrificus*, algumas diferenças foram encontradas, principalmente em relação ao comportamento físico-químico como detectado pela análise em HPLC de fase reversa.

A análise em PAGE-SDS mostrou que a PLA₂ de *C. d. cascavella* em condições não-redutoras migra como uma banda difusa de 30 kDa (Fig. 8). Bandas difusas similares já foram obtidas para as fosfolipases A₂ miotóxicas: miotoxina II de *Bothrops asper* (FRANCIS et al., 1991) e para as miotoxinas MP-I e MP-II de *Bothrops pirajai* (TOYAMA et al., 1995). Em fosfolipases típicas a transição de monômero para dímero é sugerida (HEINRIKSON et al., 1977).

A PLA₂ de *C. d. cascavella* possui uma massa molecular estimada pela análise em PAGE-SDS, em condições redutoras da fração, de 15 kDa. A análise em PAGE-SDS-Tricina mostrou que as crotapotinas F3 e F4 possuem uma massa molecular de aproximadamente 9 kDa (Fig. 9). BREITHAUPT et. al., (1974) mostraram que a crotapotina do veneno de *C. .d.*

terrificus possui uma massa molecular de 8,8 kDa, estimada por gel de filtração, e 9,45 kDa por análise de aminoácidos. E que a fosfolipase de *C. d. terrificus* apresenta uma massa molecular de 15,4-15,8 kDa, obtida por coeficiente de sedimentação e de 15,7-16,4 kDa, obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Portanto, todas as frações purificadas vindas do HPLC de fase reversa apresentam-se com alto grau de homogeneidade molecular indicando, desta forma, a eficiência do método aqui apresentado.

A análise de aminoácidos mostrou, tanto para crotapotina quanto para PLA₂, alta quantidade de meia cisteína que participam de pontes dissulfeto contribuindo para a estabilidade molecular (Tab. 4). Além disso, a PLA₂ apresentou maior quantidade de aminoácidos básicos (Lys, Arg) do que as isoformas de crotapotina F3 e F4. A composição de aminoácidos sugere uma natureza ácida para as crotapotinas devido à presença de 12% de aspartato/asparagina para F3 e F4, 14% de glutamato/glutamina para F3 e 17% de glutamato/glutamina para F4 *versus* 2% de lisina e 2% de argina para ambas. Portanto, as crotapotinas F3 e F4 possuem maior quantidade de aminoácidos ácidos conferindo sua natureza ácida. A análise em HPLC de fase reversa mostrou que as isoformas de crotapotina possuem diferenças quanto a sua hidrofobicidade devido a diferenças nos tempos de retenção de F3 e F4. Isso é reforçado pela análise da composição de aminoácidos de ambas, onde F4 apresentou maior quantidade de aminoácidos hidrofóbicos do que F3 (Tab. 4). Na visão global, as frações F3 e F4 mostraram pequenas diferenças na composição de aminoácidos demonstrando serem mesmo isoformas, ou seja, pequenas diferenças entre si com relação à estrutura primária.

A enzima PLA₂ é o principal componente de venenos de serpentes. Muitas delas tem sido envolvidas como responsáveis pela ação tóxica de muitos venenos que exibem atividades neurotóxicas, miotóxicas, hemorrágica, hemolítica, inflamatória ou citotóxica (DAVIDSON & DENNIS, 1991). Portanto, o isolamento e caracterização dessas enzimas continuam a ter grande importância e o estudo da atividade catalítica possibilita a correlação com a atividade farmacológica.

A PLA₂ do veneno de *C. d. terrificus* é uma típica PLA₂ desde que hidrolisa substratos na posição 2 e preferencialmente ataca substratos em seu estado micelar (BREITHAUPT, 1976; HOLZER & MACKESSY, 1996). A enzima PLA₂ de *C. d. terrificus* mostra um clássico comportamento Michaelis-Menten contra substratos micelares (BREITHAUPT, 1976). A enzima PLA₂ de *Crotalus durissus cascavella* apresentou uma cinética alostérica com o substrato sintético 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid (BEGHINI et al., 2000). Isso foi claramente visto no gráfico de velocidade por concentração de substrato, principalmente em baixas concentrações de substrato. Na presença de efetores alostéricos (crotopotina e heparina) a curva de velocidade apresentou uma forma sigmoidal mais acentuada. Isso demonstra que esses efetores atuaram como inibidores alostéricos. Os nossos resultados corroboram com as propriedades das enzimas alostéricas descritas em SEGEL, (1979): 1- presença de efetores atuando como moduladores alostéricos negativos (crotopotina e heparina); 2- sugestão de uma estrutura dimérica para enzima PLA₂; 3- curva sigmoidal no gráfico de velocidade por concentração de substrato.

A equação de Michaelis-Menten não se aplica a enzimas alostéricas para determinação dos parâmetros cinéticos. Portanto, para se obter a cooperatividade da ligação de um ligante a uma enzima quando esta tem mais de um sítio de ligação para aquele ligante, tem sido considerado o modelo proposto por HILL (1949). Embora esse modelo não observe o comportamento cooperativo da hemoglobina, ele tem sido muito usado na análise do fenômeno de ligação cooperativa como um método empírico para estimar o grau de cooperatividade (DIXON & WEBB, 1979). A literatura relata até o momento somente enzimas PLA₂ de venenos de serpente apresentando cinética michaeliana como as PLA₂ de *Crotalus adamanteus* (SAITO & HANAHAN., 1962), *Crotalus atrox* (WU et al., 1969), *Bothrops neuwiedii* (VIDAL et al., 1972) e *Naja naja* (SALACH et al., 1971). Os parâmetros cinéticos alostéricos e michaelianos não devem ser comparados por serem provenientes de diferentes equações (equação de Michaelis-Menten e equação de Hill). Além disso, os valores dos parâmetros cinéticos, velocidade máxima (V_{max}), coeficiente de Hill (h) e concentração de substrato ($K_{0,5}$) dependem fortemente das condições em solução (PASTRA-LANDIS et al., 1978).

Crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA₂, portanto, a crotoxina pode ser considerada como um complexo enzima-inibidor (BREITHAUPT, 1976). Além da crotapotina outros compostos também podem inibir a atividade enzimática da PLA₂, como é o caso da heparina. A interação da PLA₂ com heparina foi demonstrada para algumas PLA₂, como a miotoxina II de *Bothrops asper* (LOMONTE et al., 1994 a,b). Para a enzima de *C. d. cascavella*, a inibição por heparina foi melhor vista em altas concentrações de substrato, onde o seu caráter aniônico atuou como um modulador negativo da PLA₂.

O requerimento de Ca^{2+} é bem conhecido para muitas fosfolipases A_2 (BREITHAUPT, 1976). Nossos estudos foram feitos em presença de CaCl_2 (10 mM), no entanto, algumas fosfolipases de outras fontes são ativadas por alguns outros cátions divalentes. Por exemplo, Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Cd^{2+} ativam fosfolipases A de *Crotalus atrox* e *Laticauda semifasciata* (TU et al., 1970). A atividade da enzima PLA_2 de *C. d. cascavella* aumentou devido a exposição aos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} (Fig. 12) em concentrações subótimas de Ca^{2+} , a mesma ativação foi observada na PLA_2 de *Crotalus durissus terrificus* por BREITHAUPT (1976). Em nossos estudos, outros íons como Zn^{2+} e Cu^{2+} não mostraram ativação eficaz sobre a enzima, atuando como inibidores. Ainda na ausência completa de CaCl_2 a enzima mostrou somente baixa atividade indicando o requerimento exclusivo do íon Ca^{2+} .

No gráfico de pH de atuação da PLA_2 de *C. d. cascavella* observamos que a concentração hidrogeniônica tem grande influência sobre a atividade enzimática da PLA_2 . Assim, em valores de pH mais altos, acima de 8,5, a enzima demonstra uma relativa instabilidade. Essa característica do perfil de atividade sugere que o sítio ativo da enzima contém um grupo ionizável com um pK por volta de 7,5-8,5.

As PLA_2 isoladas de veneno de serpente são estáveis a 100°C (DEEMS e DENNIS, 1975). Assim como outras PLA_2 , a PLA_2 do veneno de *C. d. terrificus* apresenta mais alta atividade a $53-57^\circ\text{C}$ (BREITHAUPT, 1976). A PLA_2 de *C. d. cascavella* mostrou mais alta atividade a $30-40^\circ\text{C}$ (Fig. 15).

O veneno de *C. d. terrificus* possui atividades miotóxica e neurotóxica, ambas expressas pela crotoxina, a principal toxina desse veneno. A crotoxina exerce sua ação letal

através do bloqueio da transmissão neuromuscular (CHANG & LEE, 1977). O veneno de *C. d. cascavella* aqui reportado, bem como seu componente crotoxina, apresentou atividade neurotóxica bastante potente em preparação *biventer cervicis* de pintainho.

A crotoxina atua nos terminais nervosos alterando a liberação quântica de acetilcolina (HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979). A crotoxina também atua pós-sinápticamente (VITAL BRAZIL, 1966; BON et al., 1979), causando a dessensibilização farmacológica do receptor de acetilcolina (BON et al., 1979). Neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que causam paralisia agem pré-juncionalmente por bloquear a liberação de acetilcolina ou pós-juncionalmente por dessensibilizar os receptores colinérgicos nicotínicos. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados usando-se a preparação nervo frênico-diafragma de rato e de camundongo, mas podem ser diferencialmente demonstrados usando-se o *biventer cervicis* de pintainho (HARVEY et al., 1994). A atividade pré-sináptica da neurotoxina pode abolir a contração evocada, sem afetar a resposta do agonista colinérgico e a resposta do músculo por contratura induzida pelo potássio (BARFARAZ & HARVEY, 1994).

O fato de a crotoxina e o veneno total de *C. d. cascavella* não afetarem de forma significativa as respostas à acetilcolina e ao potássio adicionados a preparação *biventer cervicis* de pintainho corrobora com o que é conhecido para a crotoxina do veneno de *C. d. terrificus*, que age principalmente no terminal nervoso alterando a liberação do quanta de acetilcolina. No presente trabalho ficou demonstrado que a crotoxina e o veneno de *C. d. cascavella* possuem um efeito neurotóxico pré-sináptico predominante. Essa demonstração é

consubstanciada pelo fato de que, no bloqueio neuromuscular completo, a preparação manteve-se ainda respondendo à ação contraturante da acetilcolina e potássio.

Espera-se que a presença de componentes miotóxicos em venenos de serpente seja eficiente em reduzir a resposta contraturante do músculo esquelético à adição de concentração elevada de potássio. Como visto em nossos resultados, após o bloqueio neuromuscular completo o músculo continuou respondendo a adição de potássio, sugerindo que nas doses utilizadas não foi possível detectar o efeito miotóxico da crotoxina ou do veneno. Este resultado concorda com o que é conhecido da potência de toxinas sobre preparações isoladas, onde baixas concentrações de veneno podem revelar a presença de neurotoxinas, enquanto altas concentrações podem ser necessárias para indicar a possível presença de componentes miotóxicos (HARVEY et al., 1994).

O estudo miográfico revelou diferenças marcantes na sensibilidade ao veneno e à crotoxina de *C. d. cascavella* das preparações nervo frênico-diafragma de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho. A razão da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo mostrar-se menos sensível a ação bloqueadora neuromuscular do veneno e da crotoxina quando comparado com a preparação *biventer-cervicis*, permanecem para ser elucidadas. Três hipóteses podem ser formuladas: a primeira estaria relacionada a diferenças próprias da preparação (ave e mamífero); a segunda às características estruturais e metabólicas das fibras musculares dos dois tipos de músculos. A preparação *biventer cervicis* de pintainho, além de possuir inervação focal como o músculo diafragma de camundongo, apresenta preponderantemente inervação multifocal. Isto significa que o músculo *biventer cervicis* apresenta receptores pós-sinápticos nicotínicos distribuídos ao

longo de toda a fibra muscular, ao contrário do diafragma, que apresenta apenas uma placa motora, em uma região diminuta da fibra muscular. Como os receptores nicotínicos conferem quimiossensibilidade à fibra muscular, as fibras musculares que compõe o músculo *biventer cervicis* são quimiossensíveis em toda sua extensão (GINSBORG & WARRINER, 1960). O diafragma é um músculo vermelho, predominantemente lento e, por ser constantemente ativo, requer elevada capacidade oxidativa, sendo possível que a maior proporção de fibras lentas proporcione, ao mesmo, um certo grau de resistência à fadiga (TAKEKURA et al., 1994; JECKEL-NETO et. al., 1996). A última hipótese estaria relacionada às características farmacológicas próprias do veneno e da crotoxina de *C. d. cascavella* (ação pré-sináptica).

Na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo o veneno total de *C. d. cascavella* mostrou-se menos potente em atingir 50% de bloqueio das respostas contráteis do que seu componente crotoxina (Tab. 6). Na preparação *biventer cervicis* de pintainho o tempo requerido para bloqueio de 50% das respostas foi bastante similar entre o veneno e a crotoxina. Portanto, veneno e crotoxina de *C. d. cascavella* mostraram pequenas diferenças quanto a potência em bloquearem as respostas contráteis das preparações

Nossos resultados apontaram algumas diferenças físico-químicas no veneno e na crotoxina de *C. d. cascavella* em relação ao veneno de *C. d. terrificus*, refletindo em sua atividade biológica. Desde que o habitat de *C. d. cascavella* (cerrado do Nordeste do Brasil, região de Caatinga) é bastante diferente daquele de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*, e o hábito alimentar portanto difere das outras duas subespécies. O veneno de *C. d. cascavella* pode ter se adaptado ao tipo de presa encontrado, e essa condição pode explicar em parte as poucas diferenças encontradas (SANTORO et. al., 1999).

A principal conclusão deste trabalho é que o veneno de *C. d. cascavella* contém ao menos quatro isoformas de crotoxina formadas por diferentes combinações das crotopotinas com uma única isoforma de PLA₂. Essa situação difere da crotoxina no veneno de *C. d. terrificus*, onde a heterogenidade resulta da presença de três ou quatro isoformas de PLA₂. Desde que a toxicidade do veneno depende principalmente de seu conteúdo de crotoxina, a presença das isoformas pode contribuir para variações na neurotoxicidade.

6. CONCLUSÕES

- O método de purificação apresentado foi eficiente em purificar em unicamente duas etapas a crotoxina e suas subunidades crotapotina e PLA₂ a partir do veneno de *C. d. cascavella*. Esse método revelou a presença de quatro isoformas de crotapotina na crotoxina desse veneno, diferindo da crotoxina de *C. d. terrificus*. Isso poderia contribuir para variações neurotóxicas entre os dois venenos.
- A ausência de crotamina no veneno de *C. d. cascavella* é um forte indício da importância da crotoxina, sendo esta o componente principal do veneno.
- A enzima PLA₂ de *C. d. cascavella* apresentou uma cinética alostérica com o substrato sintético 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid. Crotapotina e heparina atuaram como inibidores alostéricos.
- O veneno de *C. d. cascavella*, bem como seu componente crotoxina, apresentou potente atividade neurotóxica em preparação *biventer cervicis* de pintainho.
- A crotoxina e o veneno total de *C. d. cascavella* não afetaram de forma significativa as respostas à acetilcolina e ao potássio adicionados a preparação *biventer cervicis* de pintainho, corroborando com o que é conhecido para a crotoxina do veneno de *C. d. terrificus*, que age principalmente pré-sinápticamente alterando a liberação de acetilcolina.
- Após o bloqueio neuromuscular completo o músculo continuou respondendo a adição de potássio, sugerindo que nas doses utilizadas não foi possível detectar o efeito miotóxico da crotoxina ou do veneno.
- A preparação nervo frênico-diafragma de camundongo mostrou-se menos sensível a ação bloqueadora neuromuscular do veneno e da crotoxina quando comparado com a preparação *biventer cervicis* de pintainho.

7. APÊNDICES

7.1. Publicação

Enzymatic characterization of a novel phospholipase A_2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Sodek, L., Novello, J. C. and Marangoni, S. *Journal of Protein Chemistry* **19(7)**, 603-607, 2000.

7.2. Congressos

VI Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia. “Contribuições da Toxinologia para o desenvolvimento das Ciências Biomédicas”. São Pedro – SP, 15-18 de Março de 2000.

- Isolation of crotoxin-like isoforms from the whole venom of *Crotalus durissus cascavella* by analytical and preparative HPLC method: biological and biochemical characterization. Toyama, M.H., Beghini, D.G., Silva, S-H. O., Rodrigues-Simione, L., Novello, J.C. and Marangoni, S.

XV Reunião Anual da FeSBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental). Caxambu – MG, 23-26 de Agosto de 2000.

- Isolation of novel Crotoxin-like proteins and their subunits from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake venom: Preliminary characterization. Beghini, D.G., Toyama, M.H., Novello, J.C. and Marangoni, S.
- Preliminary enzymatic characterization of Phospholipase A_2 (PLA₂) from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake venom. Beghini, D.G., Toyama, M.H., Hyslop, S., Novello, J.C. and Marangoni, S.

Reunião Científica Anual do Instituto Butantã. São Paulo – SP, 04-08 de Dezembro de 2000.

- Partial Enzymatic Characterization of phospholipase A_2 (PLA₂) from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake venom. Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Novello, J. C. and Marangoni, S.

XVI Reunião Anual da FeSBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental).

Caxambu – MG, 29 de Agosto a 1 de Setembro de 2001.

- Efeito neurotóxico do veneno de *Crotalus durissus cascavella* e de sua crotoxina sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho. Beghini, D. G., Toyama, M. H., Leite, G. B., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Marangoni, S.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. F. S.; RESENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. - Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **28**, 220-227, 1986
- 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 rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* **23**, 631-636, 1982.
- BARFARAZ, A. & HARVEY, A. L. - The use of chick *biventer cervicis* preparation to assess the protective activity of six international reference antivenoms on the neuromuscular effects of snake venom *in vitro*. *Toxicon* **32**: 267-272, 1994.
- BARRAVIERA, B. - Curso sobre acidentes por animais peçonhentos: Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.* **64**, 14-20, 1990.
- BARRAVIERA, B.; BONJORNO JÚNIOR, J. C.; ARARAKI, D.; DOMINGUES, M. A. C.; PEREIRA, P. C. M.; MENDES, M. P.; MACHADO, J. M.; MEIRA, D. A. A. - Retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **22**, 5-12, 1989.
- BARRIO, A. - Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamer.* **11**, 224, 1961.
- BEGHINI, D. G.; TOYAMA, M. H.; HYSLOP, S.; SODEK, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. - Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. *Journal of Protein Chemistry* **19** (7), 603-607.

- BON, C. - Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: *Venom Phospholipase A₂: Structure, Function and Mechanism*, ed by R. M. Kini, pp. 269-285, Copyright by John Wiley & Sons Ltd., New York, NY, 1997.
- BON, C.; CHANGEUS, J. P.; JENG, T. W.; FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* **99(3)**, 471-481, 1979.
- BREITHAUPT, H. - Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* **14**, 221-233, 1976.
- BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex: biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* **49**, 333-345, 1974.
- BÜLBRING, E. - Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1**, 38-61, 1946.
- CARDOSO, D. F. & MOTA, I. - Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon* **35(4)**, 607-612, 1997.
- CHANG, C. C. & LEE, J. D. - Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a pré-synaptic toxin acting like β -bungarotoxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **296**, 159-168, 1977.
- CHO, W. & KÉSDY, F.J. - Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol.* **197**, 75-79, 1991.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. - Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**, 924-929, 1988.

- DAVIDSON, F. F. & DENNIS, E. A. - Structure, function and mode of action of snake venom and other phospholipase A₂. In: *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 5, *Reptile Venoms and Toxins*, 107-145 (Tu, A. T., Ed.). New York: Marcel Dekker, 1991.
- DEEMS, R. A. & DENNIS, E. A. - Characterization and physical properties of the major form of phospholipase A₂ from cobra venom (*Naja naja naja*) that has a molecular weight of 11,000. *J. Biol. Chem.* **250**, 9008-9012, 1975.
- DELOT, E. & BON, C. - Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry* **32**, 10708-10713, 1993.
- DENNIS, E. A. - Diversity of groups types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **269** (18), 13057-13060, 1994.
- DIXON, M. & WEBB, E. C. - Enzyme Inhibition and Activation. In: *Enzymes*, Third Edition, ed. By M. Dixon and E. C. Webb, Chap. VIII, pp 332-467, Copyright by Academic Press. Inc., New York, USA, 1979.
- FAURE, G. & BON, C. - Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* **27**(2), 730-738, 1988.
- FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. - The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* **223**(1), 161-164, 1994.
- FAURE, G.; HARVEY, A. L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADYANY, F.; BON, C. - Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacology action. *Eur. J. Biochem.* **214**, 491-496, 1993.

- FLEER, E. A. M.; VERHEIJ, H. M.; DE HASS, G. H. - Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. Identification of Aspartate-49 as Ca²⁺ binding ligand. *Eur. J. Biochem.* **113**: 283-288, 1981.
- FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. I. - Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 352-359, 1991.
- GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. - The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Brit. J. Pharmac.* **15**, 410-411, 1960.
- GONÇALVEZ, J. M. & ARANTES, E. G. - Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. III Determinação quantitativa de crotamina no veneno de cascavel brasileira. *An. Acad. Brasileira Ciências* **28**, 369-371, 1956.
- 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.
- HANAHAN, D. J. - In: *Phospholipases. The enzymes*, 3rd ed., vol V, 71-85, 1971.
- HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J.B. - Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparation from rodents and chicks. *Toxicon* **32**: 257-265, 1994.
- HAWGOOD, B. & BON, C. - In: *Handbook of Natural Toxins: Reptile and Amphibian Venoms* (A. T. Tu, ed.), Marcel Dekker, New York, 3-52, 1990.

- HAWGOOD, B. J. & SANTANA DE SÁ, S. - Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* **4(2)**, 293-303, 1979.
- HAWGOOD, B. J. & SMITH, J. W. - The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotoxin complex isolated from the South American rattlesnake. *Br. J. Pharmacol.* **61**, 597-606, 1977.
- HAWGOOD, B. J. - Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, ed by A. T. Tu, pp. 121-162, Copyright MARCEL DEKKER, INC, New York, NY, 1982.
- HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **68**: 1560, 1971.
- HEINRIKSON, R. L., TRUEGER, E. T.; KEIN, P. S. - Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the venom of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.* **252(14)**, 4913-4921, 1977.
- HILL, A. V. - *Journal Physiology* (London) **40**, 4, 1910.
- HOGGE, R. A. & ROMANO, S. A. - Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan* **36**, 109, 1972.
- HOGGE, R. A. - Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes Viperidae). *Mem. Inst. Butantan* **32**, 109-184, 1965.
- HOLZER, M. & MACKESSY, S. P. - An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* **34 (10)**, 1149-1155, 1996.

- JARRET, H. W.; COOKSY, K. D.; ELLIS, B.; ANDERSON, J. M. - The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. *Anal. Biochem.* **153**, 189-198, 1986.
- JECKEL-NETO, E. A.; ROSA, A. L.; BERMUDEZ, A. L.; ITO, Y.; SATO, T.; TAUCHI, H. - Age changes in the fast and slow-twitch muscle fibers of the rat diaphragm. *Braz. J. Morphol. Sci.* **13**, 85, 1996.
- KAISER, I.I.; GUTIERREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G.V. - The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278(2)**: 319-325, 1990.
- KINI, R. M. - Phospholipase A₂ – A complex multifunctional Protein Puzzle. In: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, ed by R. M. Kini, pp 1-28, Copyright John Wiley e Sons LTD, London, England, 1997.
- KINI, R.M. & EVANS, H. J. - A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* **27**, 6, 613-635, 1989.
- KONDO, K.; TODA, H.; NARITA, K.; LEE, C. Y. - Amino acid Sequence of β 2- bungarotoxin from *Bungarus muticinctus* venom. The amino acid substitutions in the B chains. *J. Biochem.* **91**, 1519-1530, 1982b.
- KONDO, K.; TODA, H.; NARITA, K.; LEE, C. Y. - Amino acid sequences of three β -bungarotoxins (β 3-, β 4-, β 5- bungarotoxins) from *Bungarus multincinctus* venom. Amino acid substitutions in the A chains. *J. Biochem.* **91**, 1531-1548, 1982a.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS; J. B.; JOHNSON, M. A. - Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. *Toxicon* **24**, 575-583, 1986.

- LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**, 680-685, 1970.
- LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. - Inhibition of carragenin-induced rat paw o edema by crotopotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.* **114(3)**, 578-583, 1995.
- 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 induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon* **32(2)**, 217-226, 1994.
- LOMONTE, B., MORENO, E., TARKOWSKI, A., HANSON, L. A.; MACCARANA, M. - Neutralizing interactions between heparin and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* **269**, 29867-29873, 1994b.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., BAGGE, U.; HANSON, L. A. - Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmac.* **47**, 1509-1518, 1994a.
- MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FACA, V. M.; GREENE, L. J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELA, I. R.; GIGLIO, J. R. - The analgesic activity of crotoamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon* **36(12)**, 1927-1937, 1998.
- MARCONDES, M. - Snakebite induced acute renal failure: an experimental model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 82-88, 1993.

- MARLAS, G. & BON, C. - Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. *Eur. J. Biochem.* **125**, 157-165, 1982.
- MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; JÚNIOR, E. O. G.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C. - Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*, **36(10)**, 1441-1450, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília, D.F., 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Ofídicos, Brasília, D.F., 1-53, 1987.
- NAKAZONE, A. K. - Aspectos imunoquímicos da crotoxina e suas subunidades. São Paulo, 1978, 125p. Tese de doutorado, Instituto de Química, USP.
- PASTRA-LANDIS, S. C.; EVANS, D.R.; LIPSCOMB, W. N. - The effect of pH on the cooperative behavior of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. *The journal of Biological chemistry* **253**, 4624-4630, 1978.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL BRAZIL, O. - Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* **19**, 875-887, 1981.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; TAVARES, D. G.; HERTEL, R.; LOBO DE ARAÚJO, A. - Effects of convulxin, a toxin from the rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anaesthetized rabbits. *Toxicon* **19**, 661-666, 1981.

- RITONJA, A. & GUBENSEK, F. - Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim. Biophys. Acta* **828**, 306-312, 1985.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous animals and their venoms*, Vol 2, 395-362 (Bücherl, W. And Buckley, E. E., Eds.): Academic Press, New York, 1971.
- RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfraction and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.* **270**, 274-288, 1971.
- SAITO, K. & HANAHAN, D. J. - A Study of the Purification and Properties of the Phospholipase A₂ of *Crotalus adamanteus* Venom. *Biochemistry* **1(3)**, 521-531, 1962.
- SALACH, J. I.; SENG, R.; TISDALE, H.; SINGER, T. P. - Phospholipase A of Snake Venoms. *The Journal of Biological Chemistry*, **246(2)**, 340-347, 1971.
- SANTORO, M. L.; SOUSA-e-SILVA, M. C. C.; GONÇALVEZ, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, RTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. - Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **122**, 61-73, 1999.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. - Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of the proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal biochem.* **166(2)**, 368-379, 1987.

- SEGEL, I. H. - Enzimas. Em: *Bioquímica: Teoria e Problemas*, 2nd ed., ed. por I. H. Segel e tradução de Denise Mattatia Grassiano, Cap. 4, pp. 357-392, Livros Técnicos e Científicos, Editora AS, Rio de Janeiro, Brasil, 1979.
- SLOTTA, K. H. & FRAENKEL-CONRAT, H. L. - Schlangengifte, III: Mitteilung Reiningung und Krystallization des Klapperschangengiftes. *Ber. Dich. Chem. Ges.* **71**, 1076-1081, 1938.
- SMITH, L. A. & SCHMIDT, J. - Cloning and nucleotide sequence of crotamine genes. *Toxicon* **28(5)**, 575-585, 1990.
- SORENSEN, B. - Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento/Bruno Sorensen. São Paulo: Editora Atheneu, 1-45, 2000.
- TAKEKURA, H.; KASUGA, N.; YOSHIOKA, T. - Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.* **150**, 335-344, 1994.
- TOYAMA, M. H., CARNEIRO, E. M., MARANGONI, S., BARBOSA, R. L., CORSO, G., BOSCHERO, A. C. - Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta* **1474**, 56-60, 2000.
- TOYAMA, M. H.; MANCUSO, L. C.; GIGLIO, J. R.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. - A Quick Procedure for the Isolation of Dimeric Piratoxin-I and II, two Myotoxins from *Bothrops Pirajáí* Snake Venom. N-Terminal Sequencing. *Biochemistry and Molecular Biology Internacional.* **37(6)**, 1047-1055, 1995.

- TU, A. T.; PASSEY, R. B.; TOOM, P. M. - Isolation and characterization of phospholipase A from sea snake, *Laticauda semifasciata* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 96-100, 1970.
- TU, A. T. - Chemistry of Rattlesnake Venoms. In: *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, ed by A. T. Tu, pp. 247-312, Copyright MARCEL DEKKER, INC, New York, NY, 1982.
- VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; JANSEN, E. H. J. M.; PUYK, W. C. ; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HASS, G. H. - Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry*, **19(4)**, 743-750, 1980.
- VIDAL, J. C.; CATTANEO, P.; STOPPANI, A. O. M. - Some Characteristics Properties of Phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedii* Venom. *Arch. of Biochem. and Biophysics* **151**, 168-179, 1972.
- VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: *Farmacodinâmica* (Corbett, C. E., 6 ed). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1044-1074, 1982.
- VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* **33**, 981-992, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B. J. - Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **212**, 34-35, 1971.
- WU, T. W. & TINKER, D. O. - Phospholipase A₂ from *Crotalus atrox* Venom. I. Purification and Some Properties. *Biochemistry*, **8(4)**, 1558, 1969.

YANG, C. C. - Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J. Toxicol.*, **13(2)**, 125-177, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE