



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GREENE DIAS MARQUES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTICOAGULANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA CROTOXINA DE *Crotalus
durissus ruruima*.**

MANAUS/AM

2025

GREENE DIAS MARQUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DA CROTOXINA DE *Crotalus durissus ruruima*.

Monografia apresentada à Escola Normal Superior, da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito final para conclusão do curso e obtenção de título de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Sartim

MANAUS/AM

2025

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

| | |
|-------|---|
| M357i | <p>Marques , Greene Dias Isolamento e caracterização das atividades anticoagulante e anti-inflamatória da Crotoxina de <i>Crotalus durissus ruruima</i>. / Greene Dias Marques . Manaus : [s.n], 2025. 33 f.: color.; 21,0 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas- Licenciatura- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2025. Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen. Coorientador: Marco Aurélio Sartim .</p> <p>1. Crotoxina. 2. Anti-inflamatória. 3. Anticoagulante. 4. Purificação . I. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orient.) II . Marco Aurélio Sartim (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU(1997)57</p> |
|-------|---|

GREENE DIAS MARQUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA CROTOXINA DE *Crotalus durissus ruruima*.

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Escola Normal Superior - ENS, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como requisito final para obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/05/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Universidade do Estado do Amazonas – UEA (Presidente)

Profa. Dra. Gladys Corrêa da Silva

Universidade do Estado do Amazonas – UEA (Membro Titular Interno)

Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Junior

Universidade do Estado do Amazonas – UEA (Membro Titular Interno)

Dedicatória

Agradeço, primeiramente a Deus, meus orixás e aos meus guias por me permitirem chegar até aqui e me fortaleceram em todos os instantes. À minha mãe, Diene Dias, por me preparar para o mundo e me amparar. Ao meu grande amor, Pedro Atala, por nunca me deixar faltar amor, companhia e uma boa dose de alegria, por acreditar em mim, ouvir meus pensamentos e acolher todos os meus lados e nuances. À minha grande companhia Liss Stone, que me mostrou o amor singelo de uma amizade verdadeira. E a todas as partes perfeitamente imperfeitas de toda a minha trajetória até aqui, meus mais profundos agradecimentos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Dr. Hector Koolen e Dr. Marco Sartim, pela oportunidade de realização do trabalho e confiança no meu potencial. Agradeço à Lisele Brasileiro por tantos dias e noites de parceria, não seria possível chegar aqui sem seu constante apoio. Agradeço às pessoas que me auxiliaram nos laboratórios de Proteômica e Purificação de Biomoléculas do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas, em especial Genilton Cardenes e Julio Nino, e à minha equipe e colegas da Fundação de Medicina Tropical, em especial Victor Prado, David Reyes e Kamilla Freitas por todo apoio e auxílio

RESUMO

Crotalus durissus ruruima (*C.d.r*) é uma cascavel que habita a região norte do país e que possui, dentre as toxinas presentes na sua composição do veneno, a crotoxina (CTX) como a mais abundante. Estudos demonstram que essa toxina pode apresentar diferentes atividades, dentre estas, atividade anti-inflamatória e anticoagulante, entretanto, a CTX da subespécie *Crotalus durissus ruruima* (*C.d.r*) ainda não foi isolada e testada quanto suas potenciais atividades. Portanto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar atividade anti-inflamatória e anticoagulante da CTX isolada de *C.d.ruruima* em modelo *in vitro*. A partir da peçonha bruta de *Crotalus durissus ruruima*, a CTX foi purificada através de duas etapas de cromatografia líquida: cromatografia por exclusão molecular (Superdex 75GL) e cromatografia por troca aniônica (Mono-Q GL). Os procedimentos cromatográficos foram monitorados por eletroforese SDS-PAGE e ensaio de atividade fosfolipásica. Para avaliar a ação citotóxica da CTX sobre leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC), foi utilizado método de viabilidade celular medido pela redução do MTT. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada com PBMC previamente tratado com CTX e em seguida desafiado com o agente pró-inflamatório lipopolissacarídeo (LPS), após a cultura, foi coletado o sobrenadante para dosagens das citocinas IL-1 β e TNF- α . Para avaliação da atividade anticoagulante, o Plasma Pobre em Plaquetas foi incubado com diferentes concentrações de CTX (3,0; 1,5; 0,75; 0,375 e 0,1875 $\mu\text{g/mL}$) e avaliado através do teste de Tempo de Protrombina. Após etapas cromatográficas de purificação, a análise por SDS-PAGE apresentou uma banda de aproximadamente 9kDa e 15kDa, correspondentes às duas porções da toxina (CA e CB), além da presença de atividade fosfolipásica. Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que as doses de CTX de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e 0,05 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram ação citotóxica, sendo a dose 0,01 $\mu\text{g/mL}$ a mais viável. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, pudemos observar que ambas as doses de CTX foram capazes de reduzir a produção das citocinas TNF- α e que a dose de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ também foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β , sendo considerada a dose mais eficaz. Com relação ao teste de atividade anticoagulante, a dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ prolongou o tempo de coagulação. Concluiu-se, portanto, que a CTX isolada de *C.d.ruruima* demonstrou atividade anti-inflamatória e anticoagulante, representando um potencial agente terapêutico em doenças inflamatórias.

Palavras chave: Crotoxina; Anti-inflamatória; Anticoagulante; Purificação.

ABSTRACT

Crotalus durissus ruruima (C.d.r) is a rattlesnake species found in the northern region of Brazil, whose, among the various toxins present in its venom, crotoxin (CTX) is the most abundant in its venom. Studies have shown that CTX exhibits diverse biological activities, including anti-inflammatory and anticoagulant effects. However, CTX from the *Crotalus durissus ruruima* subspecies has not yet been isolated or tested for its potential biological properties. Therefore, the main objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and anticoagulant activities of CTX isolated from *C. d. ruruima* in an in vitro model. CTX was purified from crude venom through a two-step liquid chromatography process: size-exclusion chromatography (Superdex 75 GL) followed by anion-exchange chromatography (Mono Q GL). Chromatographic procedures were monitored by SDS-PAGE electrophoresis and phospholipase activity assay. To assess the cytotoxic effect of CTX on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the MTT reduction assay was employed to determine cell viability. The anti-inflammatory activity was evaluated by treating PBMCs with CTX followed by stimulation with the pro-inflammatory agent lipopolysaccharide (LPS). After incubation, culture supernatants were collected for quantification of cytokines IL-1 β and TNF- α . For anticoagulant activity assessment, platelet-poor plasma was incubated with different concentrations of CTX (3.0; 1.5; 0.75; 0.375; and 0.1875 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and tested using the Prothrombin Time assay. Following purification steps, SDS-PAGE analysis revealed bands at approximately 9 kDa and 15 kDa, corresponding to the two subunits of the toxin (CA and CB), along with confirmed phospholipase activity. Cell viability assays indicated that CTX at concentrations of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were non-cytotoxic, with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ being the most suitable dose. Anti-inflammatory activity assessment showed that both CTX concentrations reduced TNF- α production, while 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ also reduced IL-1 β levels, making it the most effective dose. Regarding anticoagulant activity, the 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose significantly prolonged clotting time. In conclusion, CTX isolated from *C. d. ruruima* demonstrated both anti-inflammatory and anticoagulant activities, suggesting its potential as a therapeutic agent for inflammatory disorders.

Keywords: Crotoxin; Anti-inflammatory; Anticoagulant; Purification.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 10 |
| 2.1 | <i>Crotalus durissus</i> | 10 |
| 2.1.1 | <i>Crotalus durissus ruruima</i> | 10 |
| 2.2 | Fosfolipase A2 | 11 |
| 2.3 | Crotoxina | 11 |
| 2.4 | Efeito anti-inflamatório da Crotoxina | 12 |
| 2.5 | Efeito anticoagulante da Crotoxina..... | 12 |
| 3 | JUSTIFICATIVA..... | 13 |
| 4 | OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 4.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 5 | METODOLOGIA | 14 |
| 5.1 | Peçanha de <i>Crotalus durissus ruruima</i> | 14 |
| 5.2 | Isolamento da Crotoxina (CTX)..... | 14 |
| 5.3 | Caracterização da Crotoxina (CTX)..... | 15 |
| 5.3.1 | Análise molecular | 15 |
| 5.3.2 | Atividade fosfolipásica..... | 15 |
| 5.4 | Avaliação de citotoxicidade..... | 15 |
| 5.5 | Atividade Anti-inflamatória..... | 16 |
| 5.5.1 | Avaliação da ação anti-inflamatória da CTX em modelo <i>in vitro</i> | 16 |
| 5.5.2 | Dosagem de citocinas | 16 |
| 5.6 | Atividade Anticoagulante | 17 |
| 5.7 | Análise de dados | 17 |
| 6 | RESULTADOS..... | 18 |
| 6.1 | Isolamento e caracterização | 18 |
| 6.2 | Atividade anti-inflamatória | 22 |
| 6.3 | Atividade anticoagulante | 23 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 25 |
| 8 | CONCLUSÃO..... | 26 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 27 |

1 INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, pertencem à família Viperidae com ampla distribuição geográfica nas Américas. No Brasil, o gênero é representado somente por uma espécie, a *Crotalus durissus*, que se subdivide em diferentes subespécies distribuídas geograficamente, dentre elas a subespécie *Crotalus durissus ruruima* está presente na região do Monte Roraima, no Norte do país (Melo; Blanco, 2014).

A composição da peçonha de *Crotalus durissus* apresenta toxinas como fosfolipases, serinoproteases, lectin-like e peptídeos, além de L-aminoácido oxidases, metaloproteases e outras (Calvete *et al.*, 2010). Dentre estes componentes, a crotoxina (CTX), uma fosfolipase A₂, é o principal componente, correspondendo a aproximadamente 82,7% na peçonha da subespécie *Crotalus durissus ruruima*. A toxina é caracterizada por ser um complexo heterodimérico ligado não covalentemente formado por uma fosfolipase A₂ básica e enzimaticamente ativa (denominada CB) e um domínio ácido não enzimático (denominado CA ou Crotapotina) (Sampaio *et al.*, 2010). Entretanto, a CTX de *C.d.ruruima* ainda é pouco explorada (Pucca *et al.*, 2021).

Por constituir a maior parte da peçonha, a CTX atua como a principal toxina causadora dos efeitos patológicos causados pelos acidentes crotálicos no Brasil, estando associados a efeitos como incoagulabilidade sanguínea, miotoxicidade e bloqueio neuromuscular. Porém, a inflamação aguda no local da picada causada pela peçonha de *C.durissus* é relativamente baixa quando comparada às inflamações causadas por acidentes botrópicos, o que indica o baixo potencial inflamatório dessa toxina (Pucca *et al.*, 2021).

Desde a sua descoberta em 1938, os estudos envolvendo a CTX tomaram um enfoque na pesquisa em relação às suas propriedades imunomodulatórias. Estudos mais recentes demonstraram que há uma tendência de resposta imunossupressora e anti-inflamatória, em modelos experimentais (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018).

Ademais, as fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de serpentes da família Viperidae (sPLA₂) apresentam efeitos de ação cardiovascular, miotoxicidade, indução e inibição de edemas, ação hemolítica e atividade anticoagulante (Kini, 2003).

Observando as tendências dos estudos envolvendo os potenciais farmacológicos da CTX, somado à lacuna de estudos aprofundados relacionados à subespécie

C.d.ruruima, torna-se evidente a necessidade de uma análise mais aprofundada sobre as atividades da CTX extraída desta subespécie. Com isto, o presente trabalho foi realizado visando contribuir com mais informações com relação a este tema.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Crotalus durissus*

Serpente pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae (Costa; Bérnils, 2018). Esta espécie ocorre em áreas secas e pedregosas, e está amplamente distribuída desde o México ao norte da Argentina, possuindo 11 subespécies distribuídas na América do Sul (Wüester *et al.*, 2005), deste total, seis subespécies são encontradas em território brasileiro (*C. d. durissus*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis*, *C.d. ruruima* e *C. d. terrificus*) (Costa; Bérnils, 2018).

2.1.1 *Crotalus durissus ruruima*

Descrita em 1965 por Hoge, a subespécie *C.d.ruruima* é encontrada no Brasil, unicamente no estado de Roraima, principalmente nas regiões de encosta do Monte Roraima (Costa; Bérnils, 2018) (Hoge, 1965). De acordo com Pucca *et al* (2021) em sua revisão sobre a subespécie, seu tamanho varia de 31,5 a 34,5cm, sendo as fêmeas normalmente maiores do que os machos, entretanto, o dimorfismo sexual ainda não foi totalmente evidenciado na subespécie *C.d.ruruima*. Ainda de acordo com a revisão, seus hábitos são noturnos, tendo uma maior atividade a partir das 19h, com um pico entre às 21h e 22h, em relação à sua atividade durante o ano, os meses de agosto à fevereiro tomam destaque, principalmente por apresentarem um clima mais seco e quente. Além disso, sua dieta é composta por pequenos mamíferos e lagartos, e sua estratégia de caça consiste em se manter camuflada e aguardar a presa se aproximar.

A peçonha crotálica é composta de uma complexa mistura de substâncias, dentre elas, fosfolipases A2 (PLA2s), com destaque para a CTX por conta da abundância presente nesta peçonha (Melo; Blanco, 2014). Em relação à composição da peçonha de *C.d.ruruima*, há uma diferença significativa na composição deste em relação ao de outras subespécies de *Crotalus durissus*, apresentando duas formas distintas denominadas “peçonha branca” e “peçonha amarela” (dos Santos, 1993), além de apresentar uma maior

concentração de crotoxina, aproximadamente 82,7% do peso molecular total da peçonha, em relação à outras subespécies, como *C.d.terrificus*, na qual a crotoxina representa em média 60% do peso molecular da peçonha bruta (Pucca *et al.*, 2021; Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018).

2.2 Fosfolipase A2

As fosfolipases são uma família de proteínas enzimaticamente ativas, que apresentam diversos potenciais. Estas podem ser classificadas em cinco superfamílias: A1, A2, B, C e D, a depender do sítio de clivagem sobre qual atuam (Macêdo, 2011). As fosfolipases do tipo A2 (doravante PLA2s) possuem ação hidrolítica sobre a ligação 2-acil-éster, na posição sn-2 de fosfolípidios, esta clivagem é responsável pela liberação de ácidos graxos livres, assim como lisofosfolípidios (como o ácido araquidônico e o ácido lisofosfatídico) (Khan; Ilies, 2023). De acordo com Kini (2003) por conta desta clivagem e liberação de diferentes moléculas no organismo, as PLA2s possuem diversas funções no organismo, sendo os principais papéis farmacológicos: anticoagulante, hipotensivo, hemolítico, inibidor da agregação plaquetária, bactericida e pró inflamatório.

A superfamília de PLA2s é dividida em 15 grupos e subgrupos, sendo estes alocados em cinco tipos distintos a depender da proteína. Dentre estes, as PLA2s encontradas em peçonhas de serpentes da família Viperidae, estão classificadas como PLA2s secretadas (sPLA2s) (Macêdo, 2011). A peçonha de *C.d.ruruima* apresenta diferentes formas de PLA2s, dentre estas a porção básica da Crotoxina, denominada CBr, a qual demonstrou possuir potencial imunoterapêutico (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018).

2.3 Crotoxina

Purificada e identificada em 1938 (Slotta, 1938), pode ser definida como um complexo heterodímero proteico composto por duas porções, uma porção básica e uma porção ácida. A porção básica, também denominada CB é a porção enzimaticamente ativa, composta por uma PLA2s, enquanto a porção ácida, denominada CA ou Crotapotina, é não enzimaticamente ativa e restrita de atividade fosfolipásica (Rübsamen; Breithaupt; Habermann, 1971).

A família das PLA2s representa a maior parte constituinte das peçonhas das subespécies de *C. durissus*, representando em média de 70-80% do total de proteínas presentes (Boldrini-França *et al.*, 2009). Dentre estas, a CTX, é considerada a mais abundante na composição das peçonhas das mesmas, chegando a 82,7% do peso molecular total da peçonha na subespécie *C.d.ruruima*. Ademais, a CTX está relacionada com os efeitos miotóxicos e neurotóxicos do envenenamento crotálico.

Estudos recentes demonstram novas perspectivas em relação à CTX, ao demonstrar seus potencial imunossupressor, anti-tumoral e até mesmo antimicrobiano, evidenciando-a como uma possível estratégia farmacológica para o tratamento de doenças. (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018; Samy *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014).

2.4 Efeito anti-inflamatório da Crotoxina

Diferente das reações causadas por envenenamentos botrópicos, os acidentes crotálicos apresentam reações inflamatórias de baixa intensidade (Pucca *et al.*, 2021). Estudos recentes demonstraram que o tratamento com crotoxina em testes *in vitro*, afetou diretamente os linfócitos B, além de promover a produção de citocinas IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Silva, 2020). Além disso, diversos outros estudos demonstram a ação de indução da produção de citocinas com desvio para a dominância anti-inflamatória, resultando, por exemplo, na redução do edema de pata e da inflamação de mucosa de cólon de camundongos (Cruz *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2015).

Esses efeitos estão associados não apenas à redução da produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6, por se tratar de uma fosfolipase A2 a CTX é responsável por ativar o metabolismo lipídico e produzir mediadores eicosanóides a partir do ácido araquidônico gerado pela toxina, ativando uma alta produção de mediadores lipídicos dependentes da 5-lipoxigenase, o que resulta na produção de Lipoxina A4, que possui atividade anti-inflamatória no organismo, assim como o aumento da produção de outros mediadores que podem apresentar efeitos anti-inflamatórios no organismo, como o IL-10, TGF- β , e prostaglandina E2 (PGE2) (Sartim *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2015).

2.5 Efeito anticoagulante da crotoxina

As sPLA2s apresentam atividades biológicas como atividade neurotóxica, miotóxica, indução de edema, agregação plaquetária, ação anticoagulante e hipotensiva. Estas atividades estão relacionadas com sua especificidade de ação sobre os sítios ativos (Cunha; Martins, 2012) (Kini, 2003). A ação da CTX sobre a coagulação já foi descrita previamente. Pesquisas mostraram que tanto o complexo CTX (CB + crotapotina) quanto seus componentes isolados apresentam uma ação anticoagulante, sendo a ação de CB de maior intensidade que a Crotapotina (Prezoto *et al.*, 2018). Em estudo feito por Oliveira (2022) a presença de crotoxina (especialmente CB), isolada da peçonha de *C.d.terrificus*, prolongou o tempo de coagulação, sendo classificada com ação anticoagulante.

O mecanismo ainda não foi definido, mas é pressuposto que a ação anticoagulante está associada à capacidade da toxina em interagir com um sítio específico (*Target site*) presente no fator Xa da cascata de coagulação, impedindo a formação do complexo protrombinase, e, portanto, impedindo a formação de coágulo através de mecanismo não-enzimático, sendo esta ação independente ou paralela à função catalítica da fosfolipase (Faure *et al.*, 2007; Nemezc *et al.*, 2020; Gimenez *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

Visto o crescimento da bioprospecção de fármacos, principalmente envolvendo biomoléculas extraídas de venenos animais, como as peçonhas das serpentes do gênero *Crotalus* e *Bothrops*, surgiu o interesse na pesquisa em relação à compreensão da atividade farmacológica e a utilização da crotoxina extraída da subespécie *C.d.ruruima*. As pesquisas em relação à atividade desta molécula *in vitro* auxiliarão no desenvolvimento das áreas de bioquímica e imunologia. Ademais, a possível utilização da toxina extraída de *C.d.ruruima*, colocaria em evidência o setor industrial e farmacêutico da região norte do país, explorando a biodiversidade da região de maneira sustentável e impulsionando a economia local.

4 OBJETIVO GERAL

Evidenciar as atividades anticoagulante e anti-inflamatória da crotoxina extraída de *C.d.ruruima* em modelo *in vitro* de inflamação e coagulação intravascular disseminada.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar crotoxina extraída da peçonha da subespécie *Crotalus durissus ruruima*;
2. Avaliar a atividade anticoagulante da crotoxina *in vitro*;
3. Avaliar a atividade anti-inflamatória da crotoxina *in vitro*.

5 METODOLOGIA

5.1 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

A peçonha foi coletada por um Herpetólogo, seguindo protocolo de extração, de um espécime de *Crotalus durissus ruruima* mantida no serpentário do Museu da Amazônia (MUSA), Manaus-AM, com autorização no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (n° 79102-1) e Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA (n° 001267/2022.018). A peçonha coletada foi submetida a centrifugação a 9.391 x g (Eppendorf® Centrifuge 5804/5804R) durante 10 minutos. Após este processo foi retirado todo o sobrenadante do microtubo de origem e aliquoteado em novo microtubo para armazenamento adequado em -80 °C.

5.2 Isolamento da Crotoxina (CTX)

A CTX foi isolada a partir do veneno bruto de *Crotalus durissus ruruima* por cromatografia líquida em coluna de exclusão molecular, como descrito anteriormente (Diz-Filho et al., 2009). Foram solubilizados 50µl de peçonha em 450µl de tampão Bicarbonato de Amônio 50 mM (pH 8,0), a solução foi aplicada a uma coluna contendo resina Superdex 75 10/300 (GE-healthcare), previamente equilibrada, e eluída com o mesmo tampão. O procedimento foi realizado em fluxo de 1 mL/min e monitorado em absorbância de 280 nm. Os picos de interesse foram então dialisados em água MilliQ para retirada dos sais e em seguida liofilizados em sistema *SpeedVac* (Thermo, EUA).

O material obtido através do processo de exclusão molecular foi então submetido à cromatografia em coluna de troca aniônica. Nesta etapa os picos selecionados foram ressuspendidos em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,4) e aplicados em coluna Mono Q em sistema AKTA FPLC (GE-healthcare), utilizando gradiente linear Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, (pH 7,4) com gradiente e monitorado em absorvância de 280 nm. A fração contendo a CTX foi liofilizada em sistema *SpeedVac* (Thermo, EUA) para armazenamento.

5.3 Caracterização da Crotoxina (CTX)

5.3.1 *Análise molecular*

O material obtido a partir dos procedimentos cromatográficos foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% e 20%, na presença de agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), e corado com azul de coomassie G-250.

5.3.2 *Atividade fosfolipásica*

Utilizou-se gel ágar/ovo, contendo CaCl₂ a 0,01 M, gema de ovo 1:3 v/v PBS, pH 7,2, ágar bacteriológico a 1%, azida de sódio a 0,005% e PBS 1x. Após a solidificação do gel em placas foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) nos quais foram aplicadas as frações de interesse diluídas em PBS, em volume final de 70µL e concentração de 20µg. O gel contendo as amostras foi mantido em estufa a 37 °C por 24 horas. A atividade fosfolipásica foi avaliada pela formação e medida de halo translúcido ao redor dos orifícios no gel. Este ensaio foi baseado em metodologia descrita por Gutiérrez *et al.* (1988), com modificações.

5.4 Avaliação de citotoxicidade

As células foram tratadas com diferentes concentrações de CTX (0,01 a 5 µg/mL) durante 24h, em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células aderidas a placa foram submetidas ao teste de citotoxicidade com MTT. O ensaio com MTT foi utilizado para medir a viabilidade celular através da sua capacidade de penetrar e reagir com as mitocôndrias ativas da placa, sendo metabolizado em cristais de

formazan que foram solubilizados com DMSO. A absorbância da placa foi medida através de leitora de microplacas modelo AccuSkan FC (Fisher Scientific). O experimento foi realizado com um N de 8.

5.5 Atividade Anti-inflamatória

5.5.1 Avaliação da ação anti-inflamatória da CTX em modelo *in vitro*

Os leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidos a partir do sangue de doadores saudáveis (CEP FMT/HVD CAAE 44561521.4.000.0005 PARECER N° 4.654.182), utilizando reagente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). As células foram plaqueadas em placa para cultura de 96 poços com fundo chato a uma concentração final de 5×10^5 células/poço em volume final de 0,5mL em meio RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino (SBF).

Essas células foram tratadas de diferentes formas com os seguintes grupos experimentais: células tratadas com meio de cultura apenas (controle), tratadas com diferentes concentrações de CTX, ou células tratadas com CTX em diferentes concentrações e desafiadas após 30 minutos com lipopolissacarídeo (1µg/mL).

Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após 24 horas, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas pró-inflamatórias.

5.5.2 Dosagem de citocinas

A detecção e quantificação de citocinas pró inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , foi feita através do método ELISA, a partir do sobrenadante coletado da cultura celular, de acordo com técnica recomendada pelo fabricante (Thermo Scientific OPTeia kit).

Brevemente, uma placa de 96 poços high-binding (Thermo Scientific) a placa foi sensibilizada com Anticorpo de Captura (Ac), específico para cada citocina, durante 12h. Em seguida a placa foi lavada utilizando Tween, e foi aplicado BSA 1% na placa para bloqueio. Após 1h a placa foi lavada novamente e as amostras de interesse foram pipetadas na placa, e incubada durante 2h em temperatura ambiente. Após as 2h, a placa foi lavada e adicionado Anticorpo de Detecção (Ad) conjugado com biotina. Após 2h de incubação, o conteúdo da placa foi lavado e aplicou-se peroxidase conjugada a

estreptoavidina em todos os poços, após 30 minutos, o conteúdo foi desprezado e adicionou-se reagente TMB. Na sequência aplicou-se ácido sulfúrico 1M e a placa foi lida em leitora de microplacas modelo AccuSkan FC (Thermo Scientific).

5.6 Atividade Anticoagulante

Amostras de sangue humano foram coletadas de doadores voluntários que não faziam uso de medicações que pudessem interferir no processo de coagulação (como anticoagulantes e agentes antitrombóticos). O sangue periférico (cerca de 15mL por doador) foi coletado em tubos Vacutainer contendo citrato de sódio 105 mM como anticoagulante. A partir do sangue coletado, foram obtidos o plasma pobre em plaquetas (PPP) para os ensaios de coagulação, além dos leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC) para os ensaios de cultura celular. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob CAAE número 44561521.4.0000.0005 e parecer de autorização número 4.654.182.

O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi obtido em duas etapas de centrifugação: inicialmente, o sangue foi centrifugado a $21 \times g$ (Eppendorf® Centrifuge 5804/5804R) por 15 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o PRP foi centrifugado a $588 \times g$ (Eppendorf® Centrifuge 5804/5804R) por 15 minutos para a obtenção do PPP. O PPP de cada doador foi mantido individualmente e armazenado a 80 °C até sua utilização nos experimentos de coagulação plasmática.

O ensaio consistiu na incubação de 100 μ L de PPP com diferentes concentrações de CTX (3,0; 1,5; 0,75; 0,375 e 0,1875 μ g/mL) durante 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado fator de protrombina (TP) para ativar a cascata de coagulação e possibilitar a avaliação da atividade anticoagulante. A medida da coagulação foi realizada pela leitura da absorbância a 405 nm em um leitor de microplacas modelo AccuSkan FC (Fisher Scientific).

5.7 Análise de dados

O software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software In - San Diego, EUA) foi utilizado para elaborar os gráficos e realizar análises estatísticas de dados. O teste t de Student foi utilizado para analisar as diferenças entre os dois grupos, enquanto a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, foi

utilizada para comparação de múltiplos grupos. A ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, foi usada para analisar os plots de tempo-resposta. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Isolamento e caracterização

Após submeter a peçonha bruta à cromatografia líquida de exclusão molecular, foram selecionados 6 picos de interesse (P1, P1.1, P2, P3, P4 e P5) (Fig. 1), dos quais a fração P2 se destacou por apresentar maior concentração proteica (Tabela 1) e o segundo maior halo no teste de atividade fosfolipásica, (Fig. 2). Além disso, após a realização do gel de poli-acrilamida a 15%, o P2 apresentou bandas de aproximadamente 9 e 15,5 kDa, que segundo literatura (Muller *et al* 2011; Breithaupt *et al* 1975) podem ser respectivos às duas bandas da CTX (cadeia A e cadeia B). Por estes motivos P2 foi selecionado como matriz para a cromatografia de troca aniônica.

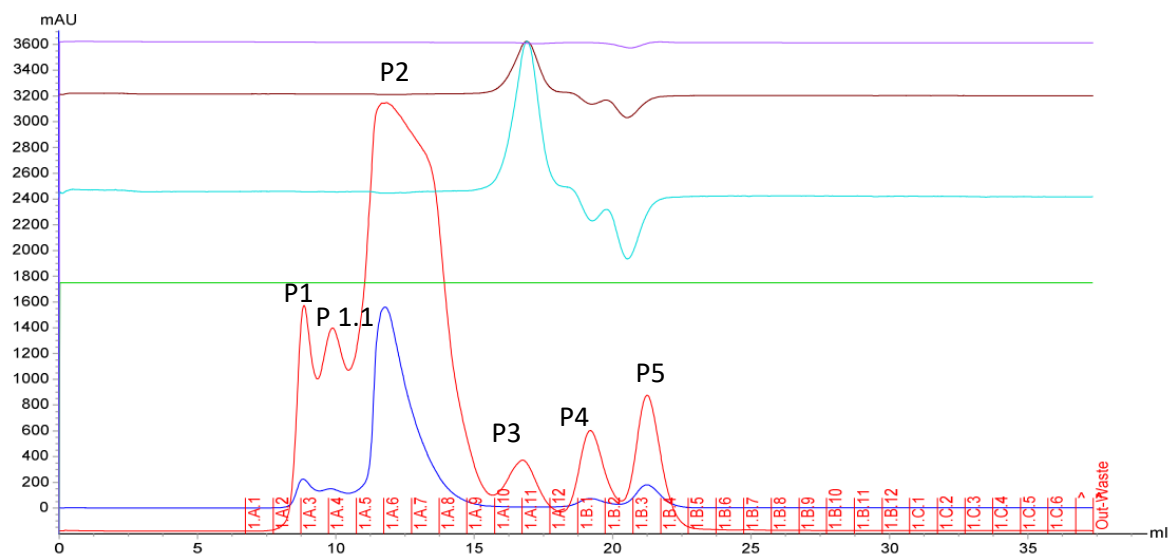


Figura 1. Cromatograma obtido após cromatografia de exclusão molecular, no qual estão identificados os picos de interesse.

Tabela 1. Valores obtidos referentes à concentração de proteínas em cada pico, obtido através da técnica de dosagem de proteínas por BCA.

| Pico | $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
|------|---------------------------|
| P1 | 0,65246235 |
| P1.1 | 0,73614825 |
| P2 | 4,0781715 |
| P3 | 0,12081726 |
| P4 | 0,1050756 |
| P5 | 0,12392826 |

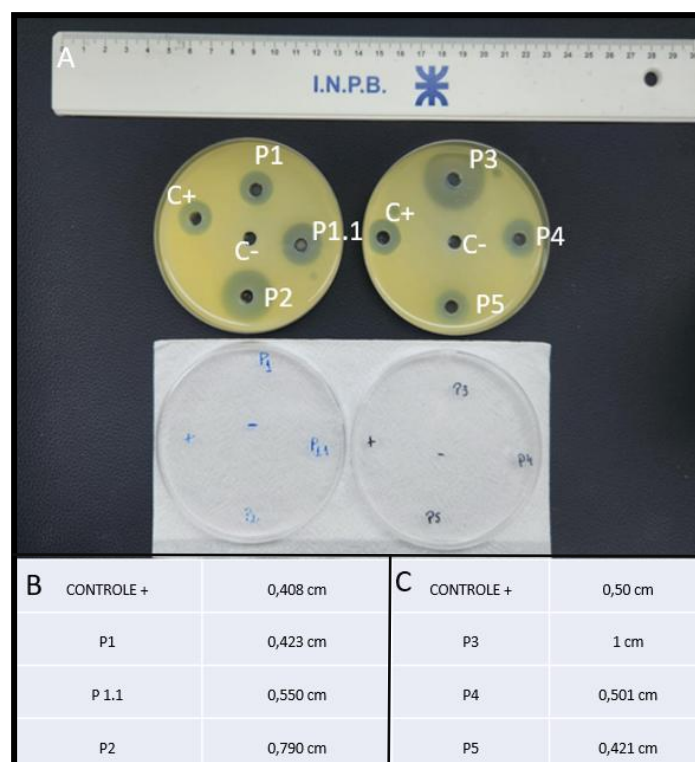


Figura 2. (A): Resultado dos halos após aplicação de 20 μg de proteína de cada amostra em gel de ágar/ovo. Controle + (C +)= veneno bruto *C.d.ruruima* (Concentração 1:100). **(B e C):** Medidas dos raios feitos por cada pico, medidos com o auxílio do *ImageJ* com destaque para a medida do diâmetro de P2.

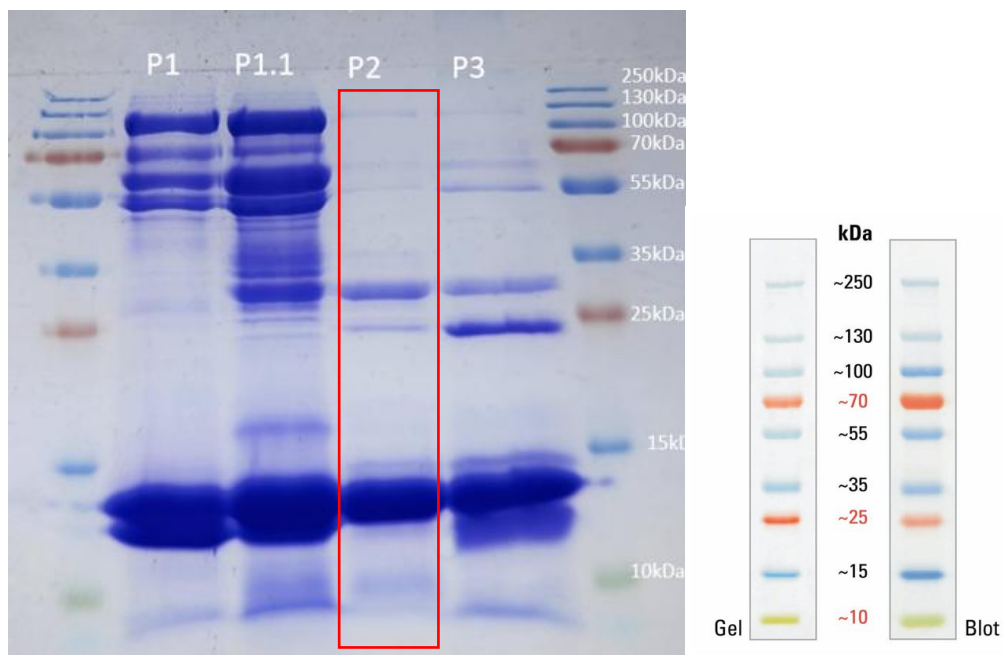


Figura 3. Resultado da eletroforese de gel de poliacrilamida a 15%, com destaque para as bandas de aproximadamente 9 kDa e 15 kDa, presentes em P2. Os picos foram aplicados em volume com 5 μ g de proteínas totais em cada. Ao lado, legenda de marcador (Pageruler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) de acordo com fornecedor (Thermo Scientific).

Com a realização da cromatografia de troca aniônica, a partir do P2, foram identificados três picos de interesse (P2.1, P2.2 e P2.3) (Fig. 4). Estes foram submetidos aos mesmos testes de caracterização (atividade fosfolipásica, SDS-PAGE e dosagem proteica). O P2.3 foi o que apresentou uma maior concentração (Fig. 5), além de apresentar um perfil eletroforético com duas bandas proteicas (~14 e 9 kDa) (Fig. 5), porém com menor atividade fosfolipásica (Fig. 5). Considerando esse o perfil característico da crotoxina descrito em literatura (Muller *et al* 2011; Breithaupt *et al* 1975; Canziani *et al*, 1983) o pico 2.3 foi selecionado para os experimentos das atividades anti-inflamatória e anticoagulantes.

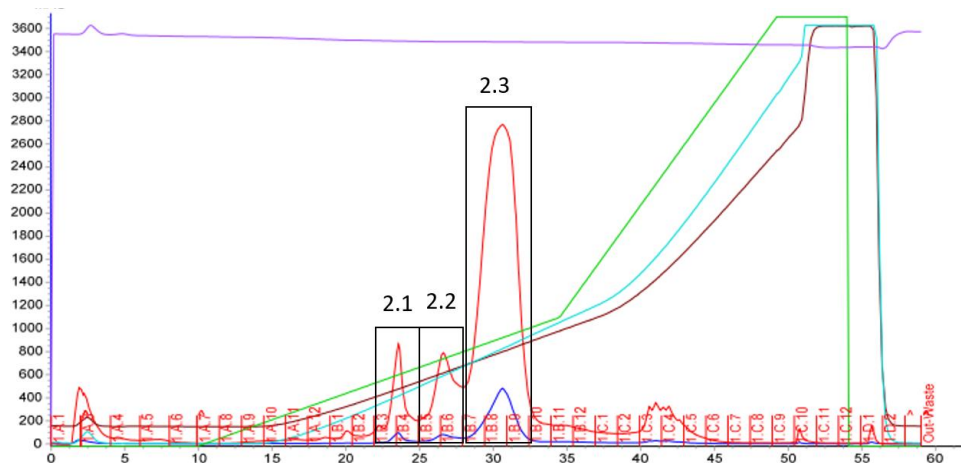


Figura 4. Cromatografia de troca aniônica. O pico 2 da etapa cromatográfica anterior (exclusão molecular) foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna em resina Mono Q (troca aniônica) como descrito na metodologia. O material eluído, em gradiente crescente de solução B contendo NaCl, foi monitorado pela medida absorvância a 280nm onde 3 picos de maior intensidade foram separados (2.1, 2.2 e 2.3).

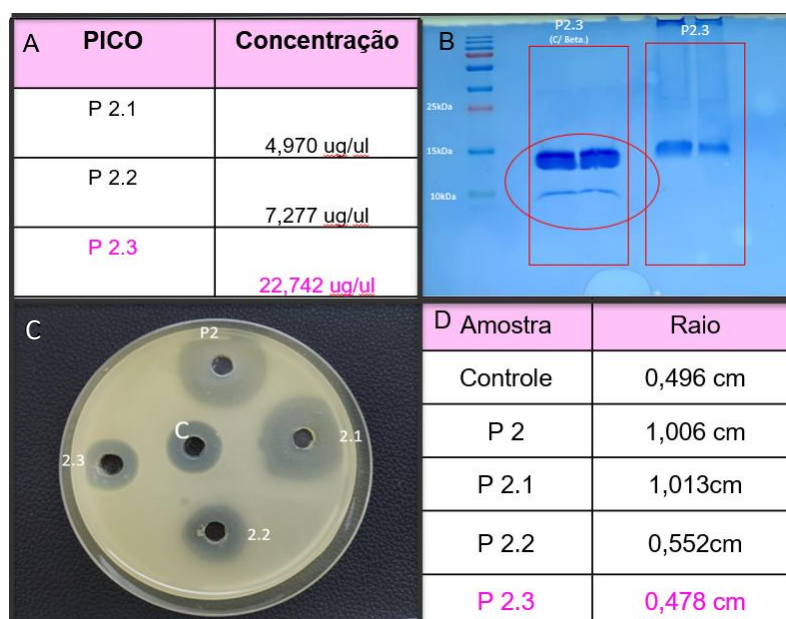


Figura 5. Resultados obtidos durante etapas de caracterização dos picos obtidos. (A): Dosagem de proteínas, na qual o P2.3 apresentou a maior concentração proteica; (B): Eletroforese em gel de poliacrilamida à 20%, no qual 2.3 apresentou duas bandas correspondentes à aproximadamente 9 e 15 kDa; (C e D): Resultado da placa de atividade fosfolipásica, na qual P2.3 apresentou o menor halo formado, resultado esperado do complexo CTX.

6.2 Atividade anti-inflamatória

Células PBMC isoladas de doadores saudáveis foram desafiadas com diferentes concentrações de CTX, em seguida as células foram submetidas aos ensaios de viabilidade celular através de MTT. Os resultados da figura 6 mostram que nenhuma das doses aplicadas apresentaram citotoxicidade, sendo a dose de 0,01 μ g/mL a mais viável (Fig. 6).

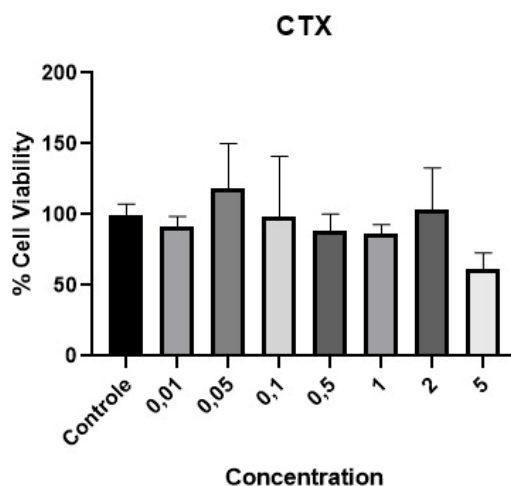


Figura 6: Ensaio de citotoxicidade em células PBMC tratados com diferentes concentrações de CTX (0,01 a 5 μ g/mL) ou meio cultura apenas (controle) pelo método de MTT. Os resultados são expressos pela a média (\pm desvio padrão) da % viabilidade celular (n=6). ANOVA) e análise estatística realizada ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey comparando os grupos tratados com CTX vs Controle (não houve diferença estatística significante).

Levando em consideração os resultados obtidos no teste de viabilidade celular, as duas menores doses foram selecionadas para dar continuidade na fase de avaliação da atividade anti-inflamatória. O sobrenadante recolhido, proveniente do tratamento celular com as duas doses selecionadas após serem desafiadas com 100ng de LPS, foi submetido ao teste ELISA para avaliar a capacidade da CTX de inibir e/ou reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β .

Ambas as doses apresentaram capacidade de reduzir a produção de TNF- α , e somente a dose de 0,01 μ g/mL foi capaz de reduzir, a produção de IL-1 β (Fig.7), sendo considerada a dose mais eficaz.

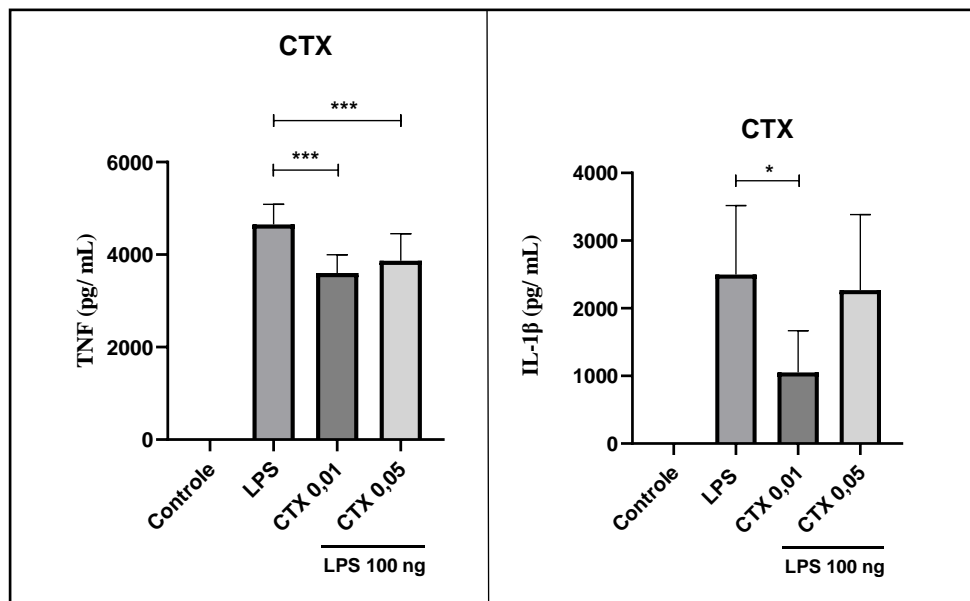


Figura 7: Células PBMC foram tratadas com meio cultura apenas (Controle), LPS apenas (LPS) ou com CTX (0,01 ou 0,05 μg/mL) previamente ao LPS. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado e as TNF-α e IL-1β quantificadas. Os resultados são expressos pelas médias das concentração de TNF-α ou IL-1β (pg/mL) (± desvio padrão). Análise estatística foi realizada pelo método ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni, onde *p < 0,05 e ***p < 0,0001 em relação aos grupos tratamento comparado ao grupo LPS.

6.3 Atividade anticoagulante

O ensaio da atividade coagulante inicialmente foi realizado somente com a incubação do PPP com diferentes concentrações de CTX (3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5 0,25; 0,05; 0,025; 0,001 μg/mL), com o objetivo de investigar se a toxina poderia apresentar uma ação pró-coagulante. Controle negativo consistiu da adição do reagente de TP (Tempo de protrombina). Os resultados mostram que nenhuma das doses de CTX foi capaz de induzir a coagulação do plasma (Figura 8).

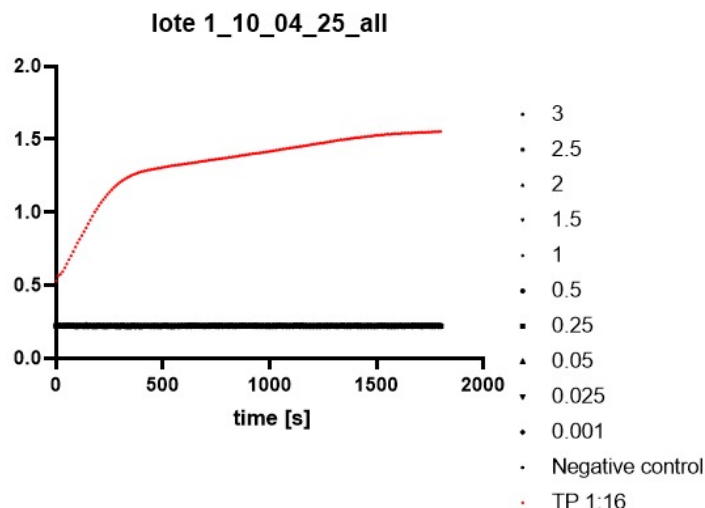


Figura 8: Curva cinética de coagulação baseada na absorbância relativa ao tempo, relacionada à concentração de CTX, em comparação ao grupo controle (TP 1:16). Resultado obtido pós tratamento de plasma com diferentes concentrações de CTX, a leitura da absorbância foi monitorada a 405 nm em um leitor de microplacas modelo AccuSkan FC (Fisher Scientific), durante 30 minutos.

Em seguida foi realizado o experimento com a incubação de diferentes doses de CTX (3,0; 1,5; 0,75; 0,375 e 0,1875 $\mu\text{g}/\text{mL}$) desafiadas com reagente utilizado para dosagem do Tempo de Protrombina, que atua como agonista de coagulação, após 30 minutos de incubação prévia (CTX + plasma). Apesar de todas as doses demonstrarem um aumento no tempo de coagulação em relação ao grupo controle, a dose de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi a única a apresentar diferença com significância estatística, sendo caracterizada, portanto, como anticoagulante (Figura 9).

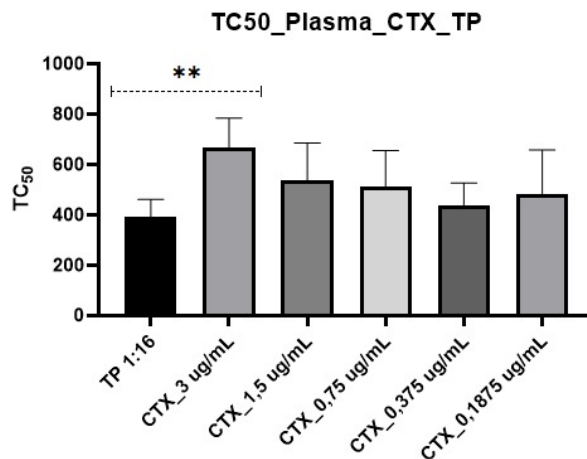


Figura 9: Plasma pobre em plaquetas humano foi incubado com diferentes concentrações de CTX (0,1875 a 3µg/mL) ou tampão apenas (TP 1:16) e após 30 minutos adicionado reagente agonista de coagulação (Tempo Protrombina -TP). Os resultados são expressos pela média do tempo de coagulação (TC₅₀) ± desvio padrão. Análise estatística realizada ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, comparando os grupos tratados com CTX vs TP 1:16, onde **p<0,01.

7 DISCUSSÃO

Com relação ao isolamento e caracterização da CTX, seguiu-se metodologia similar à utilizada por Breithaupt *et al* (1974), e obteve-se resultados condizentes, com o aparecimento de duas bandas referentes as duas porções constituintes da CTX, de aproximadamente 15 e 9 kDa, após submeter purificação por duas etapas de cromatografia líquida (exclusão molecular e troca aniônica) e análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Com relação à fosfolipásica da amostra, o pico referente ao complexo apresentou atividade reduzida em relação aos demais, similarmente à resultados de demais estudos anteriores, visto a capacidade da crotapotina de atuar como inibidor parcial da porção enzimaticamente ativa (Breithaupt *et al*, 1975; Canziani *et al*, 1983). Para confirmação mais exata de que a amostra utilizada durante este trabalho se trata da CTX seria necessário submeter às amostras ao *peptide mass fingerprint* (MPF) a fim de comprovar que se trata da sequência primária da toxina.

As doses aplicadas ao teste de citotoxicidade não apresentaram atividade citotóxica, foram selecionadas as duas menores doses (0,05 e 0,01 µg/mL) para o teste de atividade anti-inflamatória. Após submeter as células ao tratamento com as diferentes doses, foi avaliado que ambas as doses reduziram a produção da citocina pró-inflamatória TNF-α, e que a dose 0,01 µg/mL reduziu, também, a produção da citocina IL-1β, sendo

considerada a dose mais eficaz. Em seu estudo publicado no ano de 2020, Gimenez *et al* avaliou que a CTX isolada de *C.d.terrificus* apresentou capacidade de reduzir as citocinas TNF- α e IL-1 β e que a maior atividade anti-inflamatória foi observada nos grupos tratados com a menor dose (0,4 μ g/mL), os autores discutem a hipótese de que isso pode se dar devido à uma dessensibilização dos receptores envolvidos nos efeitos da CTX, causada pelas altas concentrações das amostras.

Ao realizar os testes de ação sobre a coagulação, constatou-se inicialmente que nenhuma das doses de CTX apresentou atividade pró-coagulante, em seguida, com o teste de Tempo de Protrombina (TP), foi evidenciado que a dose de 3 μ g/mL prolongou o tempo de coagulação frente ao grupo controle. Estes resultados se assemelham aos observados por Sousa *et al* (2018), que ao testar tanto o complexo crotoxina quanto suas porções isoladas constatou que a CTX isolada de *C.d.terrificus* não induziu formação de coágulo em amostras de sangue humano, e que as doses de 2.0 μ g e 4.0 μ g apresentaram aumento com diferença estatística significativa em relação ao tempo de coagulação do grupo controle, Gimenez *et al* (2020) também observou que a dose de 2,5 μ g apresentou melhor resultado em relação ao aumento no tempo de coagulação. Dessa forma, encontra-se semelhança entre resultados obtidos em estudos anteriores com os resultados demonstrados no presente estudo.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados ao longo dos experimentos realizados, o presente trabalho concluiu que a crotoxina isolada da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* apresentou propriedades anticoagulante e anti-inflamatória.

Dessa forma, a CTX apresenta potencial para ser utilizada futuramente como mecanismo terapêutico. Entretanto, mais estudos focados em aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos, atividades e efeitos da CTX isolada da peçonha de *C.d.ruruima* são necessários.

9 REFERÊNCIAS

1. Almeida, Caroline de Souza; Andrade-Oliveira, Vinicius; Câmara, Niels Olsen Saraiva; Jacysyn, Jacqueline; Faquim-Mauro, Eliana. **Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* Is Able to Down-Modulate the Acute Intestinal Inflammation in Mice.** 2015. PLoS ONE 10(4): e0121427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121427>
2. BLANCO, Benito Soto; MELO, Marília Martins. Acidente Crotálico. *In:* HEINEMANN, Marcos Bryan; SANTOS, Renato de Lima; JÚNIOR, Antônio de Pinho Marques; DA SILVA, Nivaldo (org.). **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia: animais peçonhentos.** v.75. UFMG, Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEPMVZ Editora. 2014. p 27 - p. 35.
3. Boldrini-França, Johara; Corrêa-Netto, Carlos; Silva, Marliete MS; Rodrigues, Renata Santos; De La Torre, Pilar; Pérez, Alicia; Soares, Andreimar; Zingali, Russolina; Nogueira, Romildo Albuquerque; Rodrigues, Veridiana de Melo; Sanz, Líbia; Calvete, Juan José. **Snake Venomics and Antivenomics of *Crotalus durissus* Subspecies from Brazil: Assessment of Geographic Variation and Its Implication on Snakebite Management.** J Proteomics (2010) 73:1758–76.doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.001
4. BREITHAUPT, Henning; RÜBSAMEN, Klaus; HABERMANN, Ernst. **Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex: biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospholipase A.** *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie*, v. 270, n. 3, p. 274–288, 1974.
5. BREITHAUPT, Henning; OMORI-SATO, T.; LANG, J. **Isolation and characterization of three phospholipases A from the crotoxin complex.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, v. 403, n. 2, p. 355–369, 22 out. 1975. DOI: 10.1016/0005-2744(75)90065-0.

6. CALVETE, Juan José; SANZ, Libia; CID, Pedro; DE LA TORRE, Pilar; FLORES-DÍAZ, Marietta; DOS SANTOS, Maria Cristina; BORGES, Adolfo; BREMO, Adolfo; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; ALAPE-GIRÓN, Alberto; GUTIÉRREZ, José Maria. **Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America.** *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 1, p. 528–544, 2010.
7. CANZIANI, Gabriela A.; SEKI, Chizuko; VIDAL, José C. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. *Toxicon*, v. 21, n. 5, p. 663–674, 1983. DOI: 10.1016/0041-0101(83)90272-6.
8. COSTA, Henrique Caldeira; BÉRNILS, Renato Silveira. **Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de Espécies.** *Herpetologia Brasileira*, v. 7, n. 1, 2018, p. 29.
9. Cunha, Elaine Moio da; Martins, Otávio Augusto. **Principais Compostos Químicos Presente Nos Venenos De Cobras Dos Gêneros *Bothrops* E *Crotalus* – Uma Revisão.** *Revista Eletrônica de Educação e Ciência*, [s. l.], v. 02, n. 1980, p. 21–26, 2012.
10. DOS SANTOS, Maria Cristina; FERREIRA, LCL; DA SILVA, Wilmar Dias; FURTADO, Maria de Fátima Domingues. **Caracterización de las Actividades Biológicas de los Venenos 'Amarillo' y 'Blanco' de *Crotalus Durissus Ruruima* Comparados Con El Veneno De *Crotalus durissus terrificus*. Poder Neutralizante de los Antivenenos frente a los Venenos de *Crotalus durissus ruruima*.** *Toxicon*, v. 31, 1993, p. 1459–1469. DOI: 10.1016/0041-0101(93)90211-Z.

11. FAURE G et al. **Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics.** BMC Struct Biol. 6;7:82, Dec 2007.
12. Gimenez BT, Cezarette GN, Bomfim AS, Monteiro WM, Russo EMS, Frantz FG, Sampaio SV, Sartim MA. **Role of crotoxin in coagulation: novel insights into anticoagulant mechanisms and impairment of inflammation-induced coagulation.** J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2020 Nov 27;26:e20200076. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0076. PMID: 33293940; PMCID: PMC7702976.
13. GUTIÉRREZ, José María; ÁVILA, Claudio; ROJAS, Ermila; CERDAS, Luis. **An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica.** *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411–413, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4).
14. HOGE, Alphonse Richard. **Preliminary Account on Neotropical Crotalinae (Serpentes, Viperidae).** Memórias do Instituto Butantan, v. 32, 1965, p. 109-84.
15. Khan, Shibbir Ahmed; Marc, Ilies. 2023. **The Phospholipase A2 Superfamily: Structure, Isozymes, Catalysis, Physiologic and Pathologic Roles.** International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 2, 2023, p. 1353. DOI: 10.3390/ijms24021353.
16. Kini, Manjunatha. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes.** *Toxicon*, v. 42, 2003, p. 827–840.
17. Laemmli, Ulrich K. (1970). **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
18. Macêdo, Jéssica Kele Arruda. **Análise da peçonha de Bothropoides marmoratus com ênfase na caracterização de proteínas com atividade**

- antimicrobiana e/ou antitumoral.** 2011. 104f Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
19. MULLER, Vanessa Danielle Menjon; RUSSO, Raquel Rinaldi; CINTRA, Adelia Cristina Oliveira; SARTIM, Marco Aurélio; ALVES-PAIVA, Raquel De Melo; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes; SAMPAIO, Suely Vilela; AQUINO, Victor Hugo. **Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses.** *Toxicon*, v. 59, n. 4, p. 507–515, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.021>.
20. Nemezc D, Ostrowski M, Ravatin M, Saul F, Faure G. **Crystal Structure of Isoform CBd of the Basic Phospholipase A₂ Subunit of Crotoxin: Description of the Structural Framework of CB for Interaction with Protein Targets.** *Molecules*. 2020 Nov 13;25(22):5290. doi: 10.3390/molecules25225290. PMID: 33202772; PMCID: PMC7696373.
21. Nunes, FP; Zychar, Biana Cestari; Della-Casa, MS; Sampaio, Sandra; Gonçalves, LR; Cirillo, MC. **Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors.** *Toxicon*. 2010 Jun 1;55(6):1100-6. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.011. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20034508.
22. Oliveira, Pierri Emanuel de Abreu. **Avaliação comparativa entre o efeito anticoagulante de Fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e fármacos anticoagulantes.** 2022. Dissertação de mestrado (Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2022. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/25259>
23. Prezoto, BC. *et al.* **A functional and thromboelastometric-based micromethod for assessing crotoxin anticoagulant activity and antiserum relative potency against *Crotalus durissus terrificus* venom.** *Toxicon*. 15;148:26-32, Jun 2018.

24. Pucca, Manuela Berto; Bernarde, Paulo Sérgio; Rocha, Anderson Maciel; Viana, Patrik Ferreira; Farias, Raimundo Erasmo Souza; Cerni, Felipe Augusto; Oliveira, Isadora Sousa; Ferreira, Isabela G; Sandri, Eliseu Adilson; Sachett, Jacqueline; Wen, Fan Hui; Sampaio, Vanderson; Laustsen, Andreas Hougaard; Sartim, Marco Aurélio; Monteiro, Wuelton Marcelo. **Crotalus Durissus Ruruima: Current Knowledge on Natural History, Medical Importance, and Clinical Toxinology.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.659515.
25. Rübsamen, K; Breithaupt, H; Habermann, E. **Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. subfractionation and recombination of the crotoxin complex.** *Naunyn Schmiedebergs Archiv Pharmacol.*, v. 270, n. 3, 1971, p. 274–288.
26. Sampaio, Sandra; Hyslop, Stephen; Fontes, Marcos; Prado-Franceschi, Julia; Zambelli, Vanessa; Magro, Angelo; Brigatte, Patricia; Gutierrez, Vanessa; Cury, Yara. **Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin.** *Toxicon*, v. 55, n. 6, Jun 2010, p. 1045-1060.
27. Sartim, Marco Aurélio; Menaldo, Danilo Luccas; Sampaio, Suely Vilela. **Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 24, 2018. DOI: 10.1186/s40409-018-0178-3.
28. Samy, Ramir Perumal; Pachiappan Arjunan; Gopalakrishnakone, Pon; Thwin Maung Maung; Hian, Yap E.; Chow, Vincent T; Bow, Bow; Weng, Joseph. **In Vitro Antimicrobial Activity of Natural Toxins and Animal Venoms Tested Against Burkholderia pseudomallei.** *BMC Infectious Diseases*, v. 6, 2006. DOI: 10.1186/1471-2334-6-100.
29. Silva, Talita Áurea dos Santos. **Avaliação do efeito da crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a ativação de linfócitos B e resposta imune humoral.** 2020. Dissertação de mestrado (Imunologia) Universidade de São Paulo, São Paulo. 2022.

30. Slotta, Karl Heinrich. **A crotoxina. Primeira substância pura dos venenos ofídicos.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 10, 1938, p. 195–209.
31. SOUSA, Ivancia Donato de Luna; BARBOSA, Ayrton Ramos; SALVADOR, Guilherme H.M.; FRIHLING, Breno E.F.; SANTA-RITA, Paula H.; SOARES, Andreimar M.; PESSÔA, Hilzeth L.F.; MARCHI-SALVADOR, Daniela P. **Secondary hemostasis studies of crude venom and isolated proteins from the snake *Crotalus durissus terrificus*.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 131, p. 127–133, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.059.
32. Wang, Junhua; Qin, Xiuguang; Zhang Zhiqiang; Chen Meiling; Wang, Ying; Gao Baoqin. **Crotoxin Suppresses the Tumorigenic Properties and Enhances the Antitumor Activity of Iressa® (Gefitinib) in Human Lung Adenocarcinoma SPCA-1 Cells.** Molecular Medicine Reports, v. 10, 2014, p. 3009–3014. DOI: 10.3892/mmr.2014.2620.
33. Wüster, Wolfgang; Ferguson, Julia; Quijada-Mascareñas, Adrian; Pook, Catherine; Graça-Salomão, Maria; Thorpe, Roger. **Tracing an Invasion: Landbridges, Refugia, and the Phylogeography of the Neotropical Rattlesnake (*Serpentes: Viperidae: Crotalus durissus*).** Molecular Ecology, v. 14, 2005, p. 1095–1108. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x.