

ACÇÃO DE VÁRIOS AGENTES SOBRE O EFEITO PARALISANTE DOS MEMBROS POSTERIORES INDUZIDO PELA CROTAMINA EM CAMUNDONGOS

ACTION OF SEVERAL AGENTS ON THE PARALYZING EFFECT OF THE HIND LEGS INDUCED BY CROTAMINE IN MICE

Carlos Alberto VIEIRA¹; Lucas de Oliveira VIEIRA²; João Júlio Rosa BUENO²; Maira Renata Michelutti DEBIASI²; Adriana Cristina MANCINI³; José Roberto GIGLIO⁴

RESUMO: A crotamina, neurotoxina isolada a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel sul-americana), foi a primeira proteína estudada no Brasil sob o aspecto bioquímico e farmacológico. O quadro clínico mais evidente e característico por ela induzido é a intensa paralisação dos membros posteriores quando injetada por via i.v. (este trabalho) ou mesmo i.p. (tradicional) em camundongos ou ratos. Vários fármacos, inclusive aqueles descritos como antagonistas da crotamina em diafragma isolado de rato, não foram eficientes para reverter seu efeito *in vivo*. Somente alterações químicas como acetilação de aminogrupos ou redução/carboximetilação das pontes dissulfeto conseguiram abolir completamente esse efeito.

UNITERMOS: Crotamina; Efeito paralisante; Antagonistas; Acetilação; Redução/carboximetilação.

INTRODUÇÃO

Crotamina é uma toxina de natureza polipeptídica, constituída por 42 resíduos de aminoácidos, Mr ao redor de 4880 e pI= 10,3 ($\mu=0,1$) produzida pela espécie *Crotalus durissus terrificus*, variante *crotaminus*. Seus 6 resíduos de meia-cistina formam 3 pontes dissulfeto que, em conjunto com 3 prolinas, produzem uma molécula relativamente compacta e estável.

Os primeiros estudos analíticos estruturais da crotamina foram relatados há 3 décadas (GIGLIO, 1975; LAURE, 1975), mas sua farmacologia remonta a 1951 (BARRIO & VITAL BRAZIL, 1951) que descreveram seu mais evidente efeito como “spasmodic seizure and tonic convulsion” dos animais injetados. Quando injetada em camundongos por via i.v. (5 μ g/25g) ou i.p. (20 μ g/25g), a crotamina induz paralisia flácida dos membros posteriores em aproximadamente 10 minutos (i.p.) ou menos de 1 minuto (i.v.) (este trabalho).

A crotamina induz contração do músculo esquelético de gatos, ratos e camundongos, mas não de

aves (MOUSSATCHÉ et al., 1956; GONÇALVES, 1956; CHEYMOL, BOURRILLET & ROCH-ARVEILLER, 1966; PELLEGRINI FILHO, VITAL BRAZIL & LAURE, 1976). No diafragma isolado de rato, desencadeia uma contração imediata, seguida de contrações espontâneas irregulares. Esse efeito é inibido por tetrodotoxina, Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ (CHEYMOL et al., 1971; BRAZIL, 1971). Esses e outros dados experimentais indicam que a fibra muscular é o principal alvo para a ação da crotamina. O potencial de repouso da membrana é sensivelmente reduzido pela crotamina e essa despolarização é antagonizada por tetrodotoxina ou por concentração reduzida de Na⁺, sugerindo que a crotamina ativa o canal de sódio e que, agindo na membrana de células musculares de mamíferos, altera a permeabilidade dos íons Na⁺ ou Ca²⁺ (CHEYMOL et al., 1971), aumentando o influxo desses íons. O influxo de Na⁺ causa despolarização da membrana e forte contração muscular, induzindo lesão e necrose caracterizadas pela extensa vacuolização do retículo

¹ Biólogo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, SP.

² Alunos de Iniciação Científica, Faculdade de Medicina Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP.

³ Doutora em Bioquímica pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, SP.

⁴ Professor Titular de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP / Faculdade de Medicina Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP.

Received: 12/05/05

Accepted: 30/08/05

sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina.

Estudos mais recentes da crotamina (KAWANO, LAURE & GIGLIO, 1982; ENDO *et al.*, 1989; MANCIN *et al.*, 1998; NICASTRO *et al.*, 2003) deram mais destaque a essa neurotoxina cuja função, além daquela de induzir seus efeitos farmacológicos independentes, é ainda de ativar proteases e fosfolipases A₂ presentes na peçonha e nas células do tecido injetado (MANCIN *et al.*, 1997).

OBJETIVOS

1. Demonstrar, *in vivo*, a irreversibilidade do efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela

crotamina em camundongos frente às drogas previamente descritas como reversoras/antagonistas por estudos *in vitro*. 2. Avaliar o efeito paralisante após acetilação da crotamina ou redução e carboximetilação de suas pontes dissulfeto.

MATERIAIS E MÉTODOS

A crotamina foi obtida conforme previamente descrito (MANCIN *et al.*, 1998), partindo de 500 mg da peçonha dessecada de *Crotalus durissus terrificus*.

Seu alto grau de pureza foi constatado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% para proteínas básicas (REISFELD, LEWIS & WILLIAMS, 1962) (Figura 1).

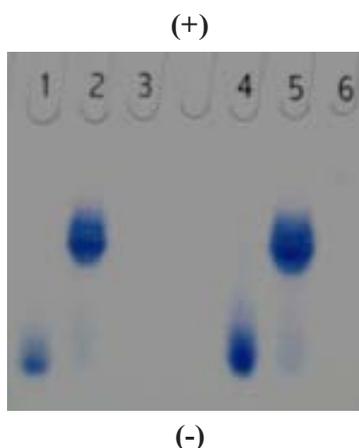


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, em tampão β – alanina/ác. acético, pH 4.5. Tempo de corrida: 65 minutos, em corrente constante de 10 mA e voltagem de 85 até 98 V. Corante: Coomassie Blue G-250 a 0,2% (m/v) em água – metanol 1:1 (v/v). Descorante: ác. acético a 7% (v/v). Comprimento do gel: 10 cm. 1 e 4: crotamina nativa. 2 e 5: crotamina reduzida/carboximetilada. 3 e 6: crotamina acetilada.

A toxina purificada foi dialisada contra água em tubos de celofane acetilado e em seguida liofilizada. Para a acetilação, tubos de diálise Sigma (Mr limite = 12000) foram inflados e cheios com uma mistura de anidrido acético mais piridina (1:1, v/v), mergulhados na mesma solução por 12 horas e posteriormente lavados exaustivamente com água. A crotamina (Mr = 4880) não é difusível através dessa celulose acetilada (GIGLIO, 1975).

Foram utilizados camundongos machos (n = 6) de 25g da linhagem Swiss, nos quais foi injetada crotamina por via endovenosa em dose pradonizada, com base na relação dose/massa (5 μ g/25g = 200 μ g/kg). Desses, metade pertencia ao grupo controle enquanto que, no restante, foram injetadas, além da crotamina e logo após a instalação do efeito paralisante por ela induzido ou em conjunto com a mesma, as substâncias classicamente descritas como antagonistas. As drogas testadas e

respectivas doses, por 25g, em camundongos, por via endovenosa, em 100 μ l de NaCl isotônico injetados, foram:

1. Diazepam : 30 a 500 μ g.
2. Li₂CO₃ : 148 μ g
3. MgSO₄ : 2mg
4. Heparina : 10 U.I.
5. Flumazenil : 100 μ g
6. Lidocaina 0,2 μ g
7. Hidantal : 0,5 μ g
8. KCl : 1,12mg
9. Tetrodotoxina (TTX) : 0,16 μ g
10. Lamictal : 500 μ g
11. Lamotrigine : 1,25mg
12. Rocurônio : 2,5 μ g

Essas doses foram previamente determinadas, em ensaios preliminares, por injeção i.v. em camundongos de 25 g, na ausência de crotamina.

A concentração da solução de crotamina foi determinada com base no seu coeficiente de extinção $E_{\lambda=280nm, 1.0mg/ml} = 2,135$ (GIGLIO, 1975).

Posteriormente, a crotamina foi submetida a dois tipos de tratamento químico, com o objetivo de alterar estruturalmente a sua natureza:

1. Acetilação (RIORDAN & VALLEE, 1967): 50mg de crotamina foram dissolvidos em 5,0 ml de fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 e, em seguida, foram adicionados 50 μ l de anidrido acético. O pH foi ajustado e mantido a 7,5-8,0 com NaOH 1N, até se estabilizar. A reação foi realizada em banho de gelo. Após estabilizado o pH, a mistura foi incubada por aproximadamente 30 minutos. Diálise subsequente foi realizada contra água em tubo de diálise, previamente acetilado, em temperatura ambiente. Após diálise, o material final foi liofilizado.

2. Redução das pontes dissulfeto e carboximetilação dos grupos -SH formados (ANFINSEN & HARBER, 1961; LAURE, 1975): 15mg de crotamina foram dissolvidos em 2,0ml de uréia 8M. Em seguida foram adicionados 34 μ l de ditiotreitol 0,1M. O pH foi levado a 8,0 com NaOH diluído e a mistura incubada por aproximadamente 30min a 37°C sob N₂. Trinta μ l de ácido iodoacético 0,5M foram acrescentados e, após 30 minutos, 100 μ l de β -mercaptoetanol. A solução foi dialisada contra água em temperatura ambiente em tubo acetilado e finalmente liofilizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma das drogas ou íons testados conseguiu reverter o efeito paralisante dos membros posteriores dos camundongos, induzido por 5 μ g de crotamina (Figura 2).



Figura 2. Efeito paralisante induzido por 5 μ g de crotamina por via i.v. em camundongos de 25 g.

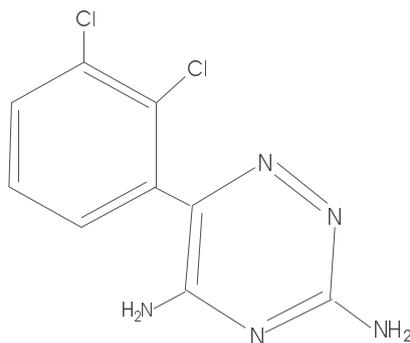
Os efeitos observados em relação à tetrodotoxina e às modificações químicas realizadas na crotamina serão descritos no final desta seção. Abaixo temos a descrição sucinta da ação farmacológica específica de cada droga ou íon:

1. Diazepam: é uma droga da classe dos benzodiazepínicos. O diazepam se liga, com forte afinidade, aos receptores do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) potencializando seu efeito inibidor (SYAPIN & SKOLNICK, 1979). Sua afinidade ao sistema neuronal GABA só pode ser compreendida com a hipótese de um receptor para benzodiazepínico independente do receptor GABA. Os benzodiazepínicos, ao se ligarem a seus receptores específicos, mudam a conformação estrutural do receptor GABA, facilitando a ação GABAérgica.

O GABA, assim, produz uma inibição mais potente do neurônio pós-sináptico (potencialização alostérica) e o efeito ansiolítico é obtido. Trabalho de revisão sobre receptores benzodiazepínicos foi publicado por CASELLAS, GALIEGUE & BASILE, 2002.

2. Carbonato de lítio (Li₂CO₃): O lítio é classicamente conhecido como um estabilizador de humor. No Brasil e Estados Unidos é formulado exclusivamente como carbonato de lítio, mas em países da Europa é vendido como acetato de lítio. Portanto, somente o íon lítio é eficaz; o respectivo ânion não interfere na ação farmacológica. Nas varicosidades ao longo das arborizações terminais dos neurônios com noradrenalina (NE) que se projetam a partir do tronco cerebral para a região anterior do cérebro, a tirosina é oxidada a

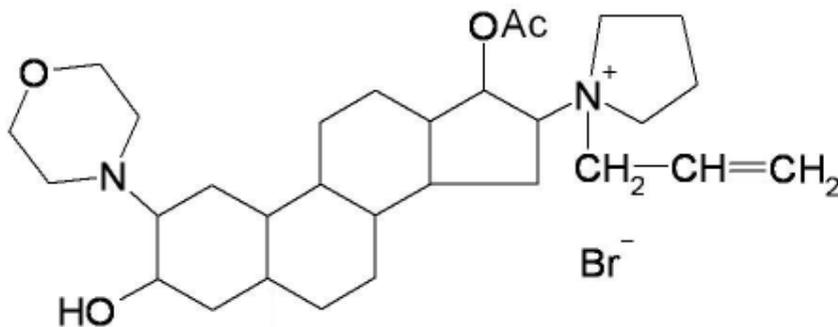
- diidroxifenilalanina (DOPA) pela tirosina-hidroxilase (TH), em seguida descarboxilada a dopamina pela descarboxilase do L-aminoácido aromático (AAD) e armazenada em vesículas, onde a β -oxidação pela dopamina β -hidroxilase (D β H) converte a dopamina em noradrenalina. Após a liberação exocítica (inibida pelo lítio) por despolarização, na presença de Ca^{2+} , a NE interage com os subtipos dos receptores α - e β -adrenérgicos pós-sinápticos, bem como com os auto-receptores α_2 pré-sinápticos. A inativação ocorre principalmente por transporte ativo (“recaptação”) para dentro dos terminais pré-sinápticos, com desaminação secundária através da monoamina oxidase (MAO) mitocondrial.
3. Sulfato de magnésio (MgSO_4): Com frequência é aplicado durante a gestação para controlar as convulsões eclâmpicas. Também é empregado como um inibidor altamente eficaz da atividade uterina. Concentrações elevadas produzem inibição progressiva da condução cardíaca e da transmissão neuromuscular, podendo, até mesmo, levar à depressão respiratória e à parada cardíaca. O magnésio previne convulsões interagindo com os receptores do N-Metil-D-Aspartato (NMDA) do sistema nervoso central.
 4. Heparina: Poliosídeo com poderosa ação anticoagulante presente em mastócitos próximos das paredes dos vasos sanguíneos e nas superfícies das células endoteliais. Sua ação anticoagulante se deve à sua capacidade de aumentar a velocidade de formação de complexos irreversíveis entre a antitrombina III e os fatores de coagulação que são serinoproteases. Assim, a antitrombina III, além de inibir a trombina, inibe os fatores XIIIa, XIa, IXa e Xa. Devido ao seu intenso caráter ácido, a heparina pode eventualmente complexar proteínas muito básicas.
 5. Flumazenil: Antagonista competitivo dos benzodiazepínicos, revertendo a ação ansiolítica e sedativa por estes causada. É também utilizado na intoxicação alcoólica.
 6. Glutationa Reduzida: Constitui um importante redutor intracelular, auxiliando na manutenção dos grupamentos SH essenciais de enzimas, em seus estados reduzidos.
 7. Lidocaína: É um anestésico local e também pode funcionar como anti-arrítmico. Os anestésicos locais evitam a geração e a condução do impulso nervoso. Seu local primário de ação é a membrana celular. Os anestésicos locais bloqueiam a condução, reduzindo ou evitando o grande aumento transitório na permeabilidade das membranas excitáveis ao Na^+ normalmente produzido por uma discreta despolarização da membrana.
 8. Hidantal: É utilizado sob a forma injetável, preferencialmente pela via venosa, quando é necessário o efeito imediato, como no controle de uma crise epiléptica aguda, um estado de mal epiléptico e nas crises de arritmia.
 9. KCl: Pequenas alterações na concentração de potássio extracelular afetam as funções de muitos tecidos excitáveis, como o esquelético e cardíaco. O potássio age também como medidor da dor isquêmica, quando em excesso.
 10. Tetrodotoxina (TTX): É uma neurotoxina não protéica, termo-estável, isolada do peixe fugu (pufferfish). Em concentrações nanomolares, bloqueia especificamente os canais de Na^+ nas membranas das células excitáveis. Como resultado, o potencial de ação é bloqueado. Nem todos os canais de Na^+ são igualmente sensíveis à tetrodotoxina (YOSHIDA, 1994). Os canais nas células musculares cardíacas e de músculo liso são amplamente resistentes, e um canal de Na^+ tetrodotoxina-insensível é observado quando um músculo esquelético é desnervado. O bloqueio dos nervos vasomotores, associado ao relaxamento do músculo liso vascular, parece ser responsável pela hipotensão que é uma característica do envenenamento por tetrodotoxina. Essa toxina causa morte por paralisia dos músculos respiratórios.
 11. Lamotrigine (LTG): O anticonvulsivante lamotrigine tem sido investigado para tratamento de desordem afetiva bipolar (antimaníaco), aparentemente como estabilizador do estado de ânimo e antidepressivo. O LTG inibe preferencialmente a hiperexcitabilidade neuronal e canais de Na^+ ativados, reduzindo a liberação excessiva de neurotransmissores no cérebro.



Lamotrigine

O LTG atua assim nos canais de sódio sensíveis a diferenças de potencial para estabilizar as membranas neuronais e inibir o neurotransmissor responsável pelo desencadeamento de crises epilépticas.

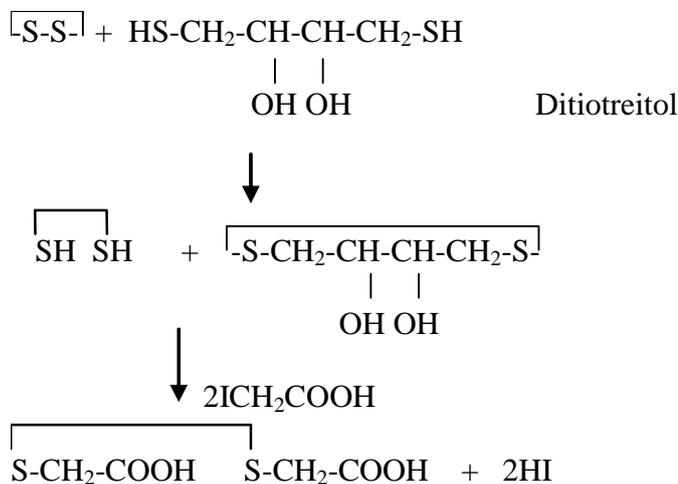
12. Rocurônio: Antagonista competitivo de receptores colinérgicos. É um bloqueador neuromuscular amino esteróide não despolarizante, com rápido início de ação (DORNELES *et al.*, 1997)



Rocurônio

13. Anidrido acético: Acetila os aminogrupos dos resíduos de Lys e o N-terminal de proteínas: $(H_3C-CO)_2O + R-NH_2 \rightarrow H_3C-CONHR + H_3C-COOH$
 14. Ditioneitol: O ditioneitol (DTT) é um forte redutor utilizado para romper pontes dissulfeto de

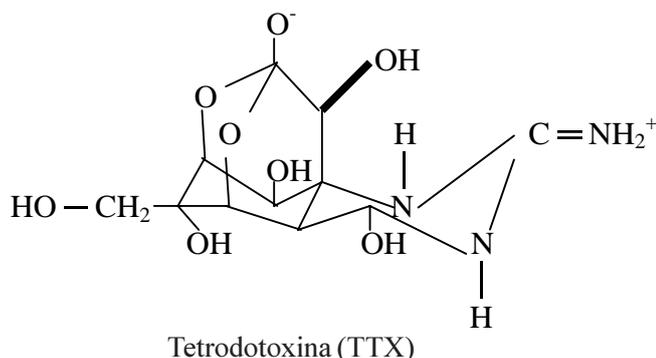
proteínas, reduzindo-as a -SH livre. Os grupos -SH espontaneamente se reoxidam em contato com o O_2 . Bloqueando os grupos -SH com ácido iodoacético, consegue-se manter a cadeia polipeptídica aberta, na forma carboximetilada.



Como destacamos acima, não houve reversão do quadro paralisante injetando-se a solução teste em conjunto ou após a crotamina. Essa irreversibilidade ocorreu em 100% dos camundongos injetados. As drogas injetadas cobrem um largo espectro de atividades biológicas, incluindo um potenciador do efeito inibidor do GABA, (diazepam); um inibidor da liberação exocítica de NE (Li^+); um inibidor da transmissão neuromuscular (Mg^{++}); um poliosídeo altamente negativado (heparina), presumivelmente capaz de complexar crotamina, com $\text{pI} = 10,3$, a exemplo do que ocorre com a crotapotina, subunidade ácida da crotoxina, formando complexo estável com a respectiva fosfolipase A_2 ; um antagonista competitivo dos benzodiazepínicos (flumazenil); um anestésico local (lidocaina); um anti-epiléptico (hidantal); um íon excitador do músculo esquelético (K^+); um poderoso bloqueador dos canais de Na^+ (tetrodotoxina), lembrando que a crotamina é um ativador desses canais; um anti-convulsivante

(lamotrigine); e um potente bloqueador neuromuscular de ação rápida (rocurônio). Da relação acima, alguns dos agentes testados (Mg^{2+} , K^+ , tetrodotoxina) representam inibidores clássicos da contratura induzida pela crotamina em diafragma isolado de rato (CHEYMOL *et al.*, 1971; BRAZIL, 1971). *In vivo*, porém, o quadro foi bem diferente, revelando uma irreversibilidade total ou incapacidade de impedir o efeito paralisante quando injetados juntamente com a crotamina. Essa irreversibilidade se repetiu para as demais drogas injetadas.

No caso específico da tetrodotoxina (TTX), potente neurotoxina extraída do fígado do peixe fugu ou baiacu (família Tetraodontidae, ordem Plectognathi), capaz de bloquear canais de Na^+ , propagação de impulsos em membranas excitáveis e liberação de glutamato, o efeito antagonizante por injeção (0,16 μg /camundongo) endovenosa posterior à crotamina (23 segundos, quando o quadro paralisante já se instalou), foi insatisfatório.



Porém, injetando previamente a tetrodotoxina (0,16 μg por camundongo) e 5 minutos após a crotamina (5 μg), observamos que a instalação do quadro ocorreu, em média, 6 minutos após a injeção, contra 23 segundos no grupo controle que recebeu somente crotamina (5 μg , dose mínima para induzir paralisia). Apesar, portanto, do enorme prolongamento do tempo médio para instalação da paralisia, verificamos que esta continua irreversível. Doses maiores de TTX (0,32 μg) ou uma segunda dose de 0,16 μg após a instalação do quadro matam os camundongos. Dessa forma a ação parcialmente protetora da TTX fica limitada pela extrema toxicidade desse composto, uma vez que 0,32 μg de TTX em dose única ou duas doses de 0,16 μg são letais.

Os resultados acima sugerem que o efeito cumulativo do TTX é lento e competitivamente anulado pela crotamina, cuja função ativadora de canais de Na^+ acaba suplantando a ação bloqueadora da TTX. O fato de a tetrodotoxina ter revertido o quadro por um curto período de tempo sugere que inibidores potentes de canais de sódio menos tóxicos do que a tetrodotoxina são agentes

promissores para antagonizar eficientemente a ação neurotóxica da crotamina em forma de antídotos.

Como alternativa final objetivando a anulação completa do efeito paralisante da crotamina, realizamos dois tipos de modificação química da mesma, a saber: acetilação e redução/carbometilação.

Após a acetilação, o pI da crotamina nativa (10,3) caiu fortemente para valor abaixo de 5, o que pode ser verificado através de eletroforese em gel de poliácridamida a 10%, sem agente desnaturante, em tampão β – alanina – ácido acético, pH 4,5. Na Figura 1 podemos constatar que a crotamina acetilada não aparece no gel porque migra para o pólo (+), ao contrário da nativa e da reduzida / carbometilada. Esta, por sua vez, migra bem atrás da nativa, em função do aumento de sua carga (-) proveniente da dissociação dos novos grupos carboxílicos formados. Muito provavelmente, a mudança de carga na molécula, em paralelo com mudanças conformacionais, bloquearam o “binding” nos receptores da crotamina. Não é surpreendente a queda brutal do pI após acetilação,

uma vez que, de um total de 42 resíduos totais de aminoácidos (LAURE, 1975), 9 são de Lys, além do resíduo N-terminal Tyr. Isso representa um bloqueio de mais de 20% dos aminogrupos livres.

Efeito similar foi observado após redução das pontes dissulfeto e carboximetilação dos grupos –SH formados. Essa modificação química produz também cargas negativas adicionais, mas fundamentalmente mudança na estrutura terciária, originalmente compactada por três pontes dissulfeto –S-S- e 3 resíduos de Pro.

CONCLUSÃO

Em resumo, podemos concluir que agentes farmacológicos relativamente potentes, incluindo aqueles

que agem comprovadamente em canais de Na⁺ e até citados como antagonistas clássicos da crotamina em diafragma isolado, não foram capazes de reverter eficientemente o quadro de paralisia induzido pela crotamina nos membros posteriores de camundongos. Essa reversão, porém, foi parcialmente observada para tetrodotoxina mas, em função do seu efeito tóxico elevadíssimo, o efeito antagônico ficou limitado. A injeção endovenosa prévia de TTX consegue prolongar o tempo necessário para a instalação visível da paralisia, mas não evitá-la.

Acetilação ou redução/carboximetilação da crotamina aboliram completamente o efeito paralisante. Em ambos os casos há diminuição do pI da molécula nativa, acompanhado de alteração da estrutura terciária.

ABSTRACT: Crotonamine, a neurotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom, was the first protein studied in Brazil biochemically and pharmacologically. The most evident and characteristic clinical picture induced by crotonamine is the intense paralysis of the hind legs when injected i.p.(traditional) or i.v.(this work) in mice or rats. Several pharmacological agents, including those reported as antagonists when assayed in the isolated rat diaphragm, were not able to reverse its paralyzing effect *in vivo*. Only chemical modifications, namely acetylation of amino groups or reduction/carboxymethylation of disulfide bonds could completely abolish this effect.

UNITERMS: Crotonamine; Paralyzing effect; Antagonists; Acetylation; Reduction/carboxymethylation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFENSEN, C.B., HABER, E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. **J. Biol. Chem.** v. 236, p. 1361-1363, 1961.
- BARRIO, A.; VITAL BRAZIL, O. Neuro-muscular action of the *Crotalus durissus terrificus* poisons. **Acta Physiol. Lat-Amer.**, v.1, p. 291-308, 1951.
- BRAZIL, O.V.; EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol.** (London), v. 212, p. 34-35, 1971.
- CASELLAS, P., GALIEGUE, S.; BASILE, A.S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochem. Internat.**, v. 40, p. 475-486, 2002.
- CHEYMOL, J.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire des venins de quelques Crotalidae, Elapidae et Hydrophiidae. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 341-354, 1966.
- CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire compare de la crotonamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus* I. Sur preparations neuromusculaires *in situ*. **Toxicon** v. 9, p. 279-286, 1971.

ENDO, T.; OYA, M.; OZAWA, H.; KAWANO, Y.; GIGLIO, J.R.; MIYAZAWA, T. A próton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crostamine. **J. Protein Chem.** v. 8, p. 807-815, 1989.

GIGLIO, J. R. Analytical Studies on Crostamine Hydrochloride. **Anal. Biochem.** v. 69, p. 207-221, 1975.

GONÇALVES, J.M. Purification and properties of crostamine. In: BUCKLEY, E.E., PORGES. N.(Ed.). **Venoms**, Washington: American Association for the Advancement of Science, 1956. p. 261-273.

KAWANO, Y.; LAURE, C. J.; GIGLIO, J.R. Laser Raman study on crostamine. **Biochim. Biophys. Acta** v.705, p. 20-25, 1982.

LAURE, C. J. Die Primärstruktur des Crostamins. Hoppe Seylers Zeit. **Physiol. Chemie** v. 356, p. 213-215, 1975.

MANCIN A.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, C.A.; AANDRÃO-ESCARSO, S.H.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. The histamine releasers crostamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A₂. **Biochem. Molec. Biol. Intern.** v. 42, p. 1171-1177, 1997.

MANCIN, A.C.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J.; ZUCOLLOTTI, S.; PELÁ, I.R.; GIGLIO, J.R. The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. A biochemical and pharmacological study. **Toxicon** v.36, p.1927-1937, 1998.

MOUSSATCHÉ, H., GONÇALVES, J.M., VIEIRA, G.D., HASSON, H. Pharmacological actions of two proteins from Brazilian rattlesnake venom. In: BUCKLEY, E.E., PORGES. N.(Ed.). **Venoms**, Washington: American Association for the Advancement of Science, 1956. p. 275-279.

NICRASTO, G.; FRANZONI, L.; CHIARA, C.; MANCIN, A.C.; GIGLIO, J.R.; SPISNI, A. Solution structure of crostamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Eur. J. BIOchem.** v. 270, p. 1969-1979, 2003.

PELLEGRINI FILHO, A.; VITAL BRAZIL, O.; LAURE, C.J. The action of crostamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. Annals of the 5th International Symposium of Animal, Plant and Microbial Toxins Costa Rica, 1976, Abstract, p. 94.

REISFELD, R.A.; LEWIS, J.; WILLIAMS, D.A. Disk electrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gel. **Nature** v. 4838, p. 281-283, 1962.

SYAPIN, P.J.; SKOLNICK, P. Characterization of benzodiazepine binding sites in cultured cells of neural origin. **J. Neurochem.** v. 32, p. 1047-101, 1979.

YOSHIDA, S. Tetrodotoxin – resistant sodium channels. **Cell Mol. Neurobiol.** v. 14, p. 227-244, 1994.