

BRO645533



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

INIS-BR--4069

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DOS PRINCIPAIS PRODUTOS GERADOS PELA IRRADIAÇÃO DE CROTOXINA

NANCI DO NASCIMENTO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.

Orientador:
Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
1995

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES**
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

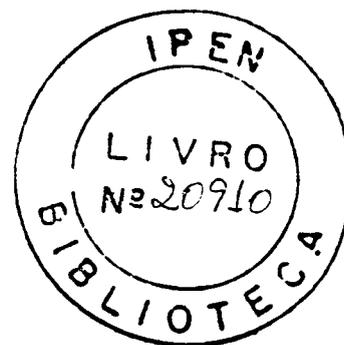
**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
IMUNOLÓGICA DOS PRINCIPAIS PRODUTOS
GERADOS PELA IRRADIAÇÃO DE CROTOXINA**

NANCI DO NASCIMENTO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear Básica.

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
1995



Heitor, prá você, que é meu espelho de inteligência,
discernimento, honestidade e força de vontade,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero, meu orientador, pela extrema confiança e apoio incondicional a mim dedicados.

Ao Dr. Ivan Kaiser, da Universidade de Wyoming - USA, que me deu a oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu Laboratório.

Aos amigos, do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Wyoming - USA, muito especialmente ao Brian e a Corrine, que não mediram esforços para me ajudar nos experimentos

Aos integrantes do do Grupo de Venenos, por terem colaborado, em muito, com a realização deste trabalho

Ao amigo Patrick, um agradecimento muito especial, pela colaboração ativa em todas as fases do trabalho, com idéias, discussões, sem se esquecer de dar um toque de carinho a tudo o que fazia.

Ao Heitor, que sempre soube ouvir, discutir, dar sugestões, enfim, participar de todos os momentos, exibindo, a cada gesto, a grandeza da sua sabedoria.

Às secretárias, Cláudia, Ieda e Rute, pela presteza e amizade

Aos funcionários, Calixto e Cicero (Biotério), Maria e Nice (Laboratório) pela colaboração constante

Ao Almir, pelo trabalho de fotografia e ao Fran, pela paciência com a parte computacional

Aos membros da Comissão de Pós Graduação do IPEN, por terem sempre lutado, dentro de seu âmbito, para oferecer aos Pós-Graduandos toda a infra-estrutura necessária.

À CAPES, pelo apoio financeiro

À Agência Internacional de Energia Atômica, pela concessão da Bolsa de Estudo para o exterior.

A "VOCÊ", que colaborou para que este trabalho fosse realizado mas que, imperdoavelmente, não foi citado.

E a vocês: D^a Nina, Milton, Osmir e Waldir, que recarregam minhas energias a cada gesto.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DOS PRINCIPAIS PRODUTOS GERADOS PELA IRRADIAÇÃO DA CROTOXINA.

NANCI DO NASCIMENTO

RESUMO

A irradiação da crotoxina e de suas subunidades com 2000 Gy de raios γ e de ^{60}Co leva à formação de agregados e produtos de menor peso molecular resultantes de quebras. Os agregados, separados por cromatografia de exclusão molecular, preservam, em parte, a estrutura original da toxina, baseado na sua reação com anticorpos monoclonais que reconhecem epitopos conformacionais da crotoxina nativa. Estes mesmos agregados podem servir de antígenos para indução de anticorpos que neutralizam a crotoxina. Quando comparados com a crotoxina nativa, os agregados apresentam menor mitotoxicidade, nenhuma atividade fosfolipásica e virtualmente atóxicos. Estes resultados indicam que a irradiação desta toxina pode promover uma significativa atenuação da toxicidade, retendo propriedades antigênicas e imunogênicas da crotoxina nativa.

**BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE
MAIN PRODUCTS OF CROTOXIN IRRADIATION.**

NANCI DO NASCIMENTO

ABSTRACT

Irradiation of crotoxin and its subunits with 2,000 Gy of γ -rays from ^{60}Co source leads to aggregation and generation of lower molecular weight breakdown products. Aggregates separated by gel filtration retain at least part of their higher-ordered structure, based on their reactivity with monoclonal antibodies known to react with conformational epitopes in native crotoxin. These same aggregates can serve as antigens to raise antisera that cross-reacts and neutralizes crotoxin. Compared with native crotoxin, aggregates appears less myotoxic, are largely devoid of phospholipase activity, and are virtually non-toxic in mice. These results indicate that irradiation of toxic proteins can promote significant detoxification, but still retain many of the original antigenic and immunological properties of native crotoxin.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I - INTRODUÇÃO | 1 |
| RADIAÇÃO IONIZANTE | 3 |
| SERPENTES E O ENVENENAMENTO | 8 |
| Venenos | 9 |
| I - OBJETIVO | 23 |
| III - MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| MATERIAIS | 24 |
| MÉTODOS | 24 |
| III.1- Irradiação das proteínas | 24 |
| III.2- Isolamento da crotoxina à partir do veneno total: | 25 |
| a) Cromatografia de exclusão molecular | 25 |
| b) Cromatografia em resina de troca iônica | 26 |
| III.3- Isolamento de agregados formados durante a irradiação | 26 |
| III.4- Purificação das subunidades | 26 |
| a) Subunidade ácida: | 26 |
| b) Subunidade básica: | 27 |
| III.5- Análise por eletroforese em SDS-PAGE | 27 |
| III.6- Determinação da atividade tóxica | 28 |
| III.7- Atividade fosfolipásica | 28 |
| III.8- Produção de anticorpos | 28 |
| III.9- Ensaio imunoenzimático (ELISA) | 30 |
| III.10- Neutralização <i>in vivo</i> | 31 |
| III.11- Neutralização <i>in vitro</i> | 32 |
| III.12- Dosagem sérica de creatinaquinase | 32 |
| III.13- Mapa de peptídeos | 33 |
| Redução e alquilação da subunidade básica | 33 |
| b) Digestão e cromatografia da subunidade básica | 34 |
| c) Redução e alquilação da subunidade ácida | 34 |
| IV - RESULTADOS | 36 |
| IV.1 - Purificações cromatográficas e irradiação das proteínas | 36 |

| | |
|--|----|
| IV.2 - Eletroforese | 40 |
| IV.3-Atividade Tóxica | 41 |
| IV.4 - Atividade fosfolipásica | 42 |
| IV.5 - Atividade de creatinaquinase | 44 |
| IV.6 - Produção de anticorpos | 45 |
| IV.7 - Neutralização <i>in vivo</i> | 45 |
| IV.8-Neutralização " <i>In-vivo</i> " | 46 |
| IV.9 - Ensaio com anticorpos monoclonais | 47 |
| IV.10 - Mapa de Peptídeos | 51 |
| V - DISCUSSÃO | 53 |
| VI CONCLUSÕES | 58 |
| VII REFERÊNCIAS | 59 |

I - INTRODUÇÃO

Como discutido por Warrell (1986), envenenamento por picada de serpente é um problema clínico importante, especialmente em áreas tropicais, e é de considerável importância que um tratamento eficaz esteja disponível.

Já em 1907, CALMETTE mostrou que a soroterapia anti-veneno constitui o melhor meio terapêutico, sendo esta idéia complementada por BRAZIL, 1909 que mostrou que os anti-soros devem ser específicos para cada gênero de serpente. Assim, vários pesquisadores têm descrito a capacidade dos anti-venenos em neutralizar a letalidade e as ações específicas dos venenos de serpentes (SADASHIRO, 1978; JOHNSON, 1987; CLAUS & MEBS, 1989; DART et al., 1990; LI, 1990^A, 1990^B; LOMONTE, 1990; LAING & THEAKSTON, 1993).

Paralelamente a isso, vários estudos têm sido feitos no sentido de se conseguir a produção de anti-venenos mais potentes (BOQUET, 1979; CHRISTENSEN, 1979; REID, 1983; LI & OWNBY, 1992).

No Brasil, os equinos têm sido empregados na produção de soro contra o veneno das nossas serpentes desde 1901 (BRAZIL). Cabe lembrar entretanto que estes animais, apesar do grande porte, sofrem com a injeção do veneno e por isso apresentam diminuição da longevidade quando comparado com os cavalos não imunizados (ROSENFELD, 1971).

Tem-se tentado ainda, imunização de outros tipos de animais que pudessem fornecer uma melhor resposta imunológica, como carneiros, que se mostraram mais efetivos na produção de soros que neutralizam a toxicidade, a

atividade fosfolipásica e inibem os efeitos farmacológicos do veneno (SJOSTROM et al., 1994).

Datam de 1894 (PHISALIX & BERTRAND) os primeiros estudos sobre as vantagens da utilização de uma preparação atóxica de veneno na imunização de equinos.

Incorporação de venenos por lipossomos (FREITAS et al., 1989; LAING & THEAKSTON, 1993 e ANTIMISIARIS et al., 1993) estabilizados com OsO_4 constitui uma ferramenta promissora para aumentar o efeito protetor do anti-soro. O procedimento de destoxicação foi sempre lembrado, e tem sido mostrado que toxinas tratadas com glutaraldeído podem ser mais apropriadas para melhorar a efetividade do anti-veneno (POSSANI et al., 1981; TAN, 1983; GUIDOLIN et al., 1989 e HUANG, 1990). O uso de formaldeído também vem sendo amplamente testado na destoxicação de venenos (KONDO, 1971; GRILLO & SCANNANE, 1976 e COSTA et al., 1985) assim como o tanino (OKONOGI et al., 1979), calor (RELYVELD et al., 1974 e CARROL et al., 1992), inibidores de centro ativo (HIGASHI et al., 1989), clorpromazina e quinacrina (CROSLAND, 1989).

Outros processos como o de iodação também tem sido utilizado com o intuito de diminuir a letalidade das toxinas (HENEINE et al., 1986; 1988, 1992; DANIEL et al., 1987 e BICALHO et al., 1990), assim como a fotooxidação (SHORTT & MALLICH, 1935), irradiação com raios X (FLOWERS, 1963), e ultravioleta (TEJASEN E OTTOLENGHI, 1970). Recentemente, técnicas envolvendo biologia molecular (mutagênese sítio dirigida) têm sido utilizadas para remover a toxicidade das toxinas (LI et al., 1994).

A radiação ionizante, a exemplo das metodologias citadas anteriormente, vem sendo utilizada, na destoxicação de venenos de serpentes indianas, diferindo entretanto das demais técnicas, por conseguir associar diminuição da toxicidade com manutenção das propriedades imunológicas da amostra irradiada, sem adição de quaisquer outras substâncias à mesma (PURANANANDA, 1972; SALAFRANCA, 1973; KANKONKAR et al., 1975; BARIDE et al., 1980; HATI et al., 1989 e MANDAL et al., 1991, 1993).

A insuficiência de produção de soros anti-peçonhentos, agravada à partir de 1984, levou a um período de escassez de antivenenos no Brasil, e o IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) que já desenvolvia, desde 1978, pesquisas envolvendo venenos de serpentes (ROGERO, 1978; NAKAZONE et al., 1983, 1984), direcionou as pesquisas deste grupo para o estudo dos efeitos da radiação ionizante sobre venenos de serpentes brasileiras (MURATA, 1988; COSTA, 1988; SOUZA FILHO, 1991; NASCIMENTO, 1991; GUARNIERI, 1992; CARDI et al., 1992 e ANDRIANI, 1995).

RADIAÇÃO IONIZANTE

A irradiação de proteínas tanto no estado seco como em solução aquosa causa várias mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e na estrutura secundária e terciária destes polímeros (ALEXANDER & HAMILTON, 1961). Estas mudanças estão relacionadas com a perda da atividade enzimática, hormonal ou

tóxica, assim como com mudanças das propriedades imunológicas após a irradiação (SKALKA & ANTONI, 1970)

A energia absorvida à partir da radiação ionizante pode inativar material biológico de duas maneiras:

- efeito direto: que ocorre quando o evento primário, isto é, a ionização, é produzida na própria molécula. Esse efeito se apresenta quando um componente puro é irradiado no estado seco.

- efeito indireto: que resulta de reações entre as moléculas estudadas e os produtos da interação da radiação com a água ou outros solventes, dado que só ocorre quando se irradia material em solução. Componentes altamente reativos, chamados produtos da radiólise da água, na sua maioria radicais livres, são formados e sofrem várias reações entre eles, com o gás dissolvido e com outras moléculas na solução. Assim, quando o componente é irradiado em solução, o efeito indireto se une ao direto.

O efeito indireto da radiação mostrou uma maior sensibilidade das soluções diluídas na presença de oxigênio assim como um efeito protetor de outras substâncias orgânicas presentes na solução. Este fato mostra que o efeito final da irradiação de proteínas diferirá de acordo com as condições de irradiação. Outros fatores que também influenciam o efeito da radiação são o tipo e a qualidade de irradiação.

Assim, deve-se manter um controle rígido das condições físicas de irradiação (fonte, dose ou exposição, dose ou taxa de exposição, temperatura, presença de gases), condições químicas (estado seco ou solução, concentração da amostra, tipo de solução, composição da amostra, etc), condições biológicas (toxicidade, antigenicidade, conteúdo enzimático, etc)

Segundo KEMPNER, 1987, os raios gama e elétrons de alta energia causam ionizações ao acaso através da massa da matéria colocada no campo da radiação. Esses eventos iniciais ou ionizações primárias ocorrem principalmente com os elétrons do orbital nos átomos de macromoléculas.

Cada ionização primária resulta na transferência de 65 elétron Volt (≈ 1500 Kcal/mol) da radiação para a molécula alvo. Esta energia é absorvida por uma variedade de mecanismos atômicos e moleculares incluindo excitações, ionizações e formação de radicais livres. Alguns desses mecanismos resultam em mudanças irreversíveis na macromolécula por quebras de ligações covalentes e mudanças conformacionais. Uma vez que a grande maioria das moléculas do material biológico é água, muitas das interações da radiação resultam na produção de OH \cdot , H₂O₂ e uma variedade de outros produtos potencialmente danosos. Em solução líquida, esses produtos da radiólise da água podem difundir e reagir com macromoléculas bioquimicamente ativas e causar perda de atividade biológica.

No caso da radiação ionizante, a espécie mais reativa gerada pela radiólise da água é o radical hidroxila (OH \cdot) (CHAPMAN et al., 1973) que junto com o ânion superóxido (O₂ \cdot^-) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como um produto molecular é capaz de produzir dano às moléculas (GREENSTOCK, 1981, 1984^A).

A ionização ocorre dentre de picosegundos pela formação de radicais hidroxilas livres e elétrons hidratados que são as principais espécies formadas:



Enzimas puras, em soluções muito diluídas, são inativadas por exposições da ordem de 100 Gy entretanto, exposições de 10000 Gy ou mais são necessárias para inativar preparações secas ou enzimas em solução contendo outros componentes. A contribuição relativa dos efeitos indiretos da radiação foi mostrada pelo fato de serem necessárias doses progressivamente maiores de radiação para destruir uma amostra mantida congelada comparada com uma amostra em solução líquida, à temperatura ambiente. A mesma disparidade é observada entre amostras líquidas e liofilizadas irradiadas à mesma temperatura. Isto sugere que, virtualmente, todos os danos a amostra em água são devidos ao efeito indireto (secundário).

A análise química da irradiação de proteínas revelou dano nas cadeias laterais dos amino-ácidos (aumento de alanina e aparecimento de ácido aminoisobutírico, formado pela descarboxilação dos ácidos glutâmicos e aspártico, respectivamente) e a produção de novos grupos (carboxil e amido pela cisão das ligações C-N nos amino-ácidos e dos grupos S-S com formação dos grupos S-H (ALEXANDER & HAMILTON, 1960, 1961). Há também evidencia da cisão das ligações peptídicas e a formação de ligações intra e inter-moleculares.

As mudanças moleculares em proteínas irradiadas consistem basicamente em degradação das e mudanças nas propriedades físico-químicas. A degradação entretanto pode ser mascarada pela extensiva agregação (BAILEY et al, 1964)

Proteínas irradiadas podem formar ligações covalentes intermoleculares que contribuem para a sua precipitação, como agregado. O desenvolvimento da insolubilidade nas proteínas expostas à radiação ionizante tem sido amplamente estudada para avaliar a agregação molecular (HAJOST & DELINCÉE, 1983)

Devido ao desdobramento da molécula, alguns novos grupos se tornam acessíveis para reações específicas (ALEXANDER & HAMILTON, 1961; ALEXANDER, 1962) ou alguns desaparecem devido ao rearranjo da molécula (ALEXANDER, 1962).

A interação da radiação e/ou efeitos primários dos radicais com as proteínas tem importante papel nas mudanças radioinduzidas observadas (DIZDAROGLU et al., 1984). SKALKA & ANTONI, 1970, mostraram que várias funções das proteínas apresentam diferentes radiosensibilidades. A maioria dos resultados mostram que as propriedades antigênicas são mais radiorresistentes que qualquer outra função biológica da proteína.

Os procedimentos para a produção de anti-venenos pelos métodos convencionais são complicados pela toxicidade inerente ao veneno, e assim, qualquer método que reduza a toxicidade sem alterar as propriedades imunológicas do veneno, teria significativo papel na produção dos anti-venenos.

Após a picada a administração do anti-veneno é o único tratamento de eficácia para as vítimas. Entretanto, em muitos casos, o tratamento com anti-veneno é demorado e danos irreversíveis já ocorreram. Ainda algumas vezes, o desenvolvimento da lesão é tão rápido que o anti-veneno sozinho não pode neutralizar o efeito local

quando grandes quantidades de veneno são introduzidas no corpo. O desenvolvimento de um apropriado e efetivo método de imunização ativa de população exposta aos riscos de picadas de serpentes pode ser de grande importância como medida de proteção. (HATI et al., 1989, 1990)

SERPENTES E O ENVENENAMENTO

Serpentes (classe *Reptilia*, ordem *Squamata*) provavelmente surgiram na era Cretácea, cerca de 100 a 120 milhões de anos atrás e compreendem cerca de 3200 espécies, porém a evolução das 1300 formas venenosas apareceu há pouco mais de 20 milhões de anos e são identificadas em apenas 4 famílias: *Elapidae*, *Hydrofidae*, *Viperidae* e *Colubridae*.

As serpentes responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos pertencem à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae* cujos principais gêneros são: *Bothrops*, *Crotalus*, e *Lachesis*.

No Brasil, onde ocorrem cerca de 20000 acidentes por serpentes peçonhentas, com 100 óbitos por ano (JORGE & RIBEIRO, 1990), dois gêneros de serpentes se destacam: o gênero *Bothrops*, por representar cerca de 85% dos acidentes notificados e o gênero *Crotalus*, com alta letalidade sendo observada em acidentados envolvendo serpentes deste gênero. Esta letalidade chega a 72% nos casos não tratados com soro anticrotálico e 11% nos casos tratados (ROSENFELD, 1991)

As serpentes do gênero *Crotalus* (cascavel, cascavel de quatro ventas, boicininga, boiçununga, cobra de guizo, maracá) são encontradas principalmente em regiões semi-áridas (AMARAL, 1977). No País, as serpentes da subespécie *C. d. terrificus* são responsáveis por 14% dos acidentes (RESENDE et al., 1989, RIBEIRO et al., 1990); e no Estado de São Paulo, por 8% (RIBEIRO et al., 1993) todas pertencem à espécie *Crotalus durissus* com subespécies tais como *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis*, *C. d. trigonicus* e *C. d. ruruima* (CAMPBELL & LAMAR, 1990), sendo a subespécie *C. d. terrificus* responsável por quase todos os casos de acidente crotálico atendidos no Hospital Vital Brazil (JORGE & RIBEIRO, 1992).

Venenos

Venenos de cascaveis são misturas complexas de proteínas tóxicas com múltiplos efeitos bioquímicos, imunológicos, farmacológicos e patológicos, que podem induzir a lesão do tecido local, efeitos sistêmicos, morbidade e/ou morte relacionada com a toxicidade do veneno. Esse tipo de envenenamento é caracterizado pelo aparecimento de face neurotóxica, ptose palpebral, diplopia, e em casos graves, insuficiência respiratória (ROSENFELD, 1971). Além disso, possui uma potente ação miotóxica sistêmica (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; 1987; 1992) que, em muitos casos, induzem à insuficiência renal aguda (ROSENFELD, 1971).

CUPO et al., em 1988 concluíram que os sinais e sintomas exibidos por pacientes picados por *C. d. terrificus* são devidos apenas a ação neurotóxica e miotóxica do veneno. Essa ação neurotóxica, segundo VITAL-BRAZIL, 1990, deve ser atribuída a ação neuromuscular periférica das peçonhas ofídicas.

A reação local induzida, pelo veneno de cascavel, é caracterizada por edema discreto e sem lesões teciduais relevantes. A dor, quando existe, é de pequena intensidade e tem sido relatada parestesia no local da picada (ROSENFELD, 1971; AZEVEDO-MARQUES et al., 1992). Estudos experimentais mostraram uma ação anti-nociceptiva e analgésica do veneno (GIORGI, 1993, GIORGI et al, 1993).

Assim, são três as principais ações do veneno crotálico:

a) Neurotóxica: os venenos de algumas serpentes elapídeas e crotalídeas contêm potentes toxinas as quais inibem a transmissão neuro-muscular bloqueando especificamente a liberação de acetil colina (CHANG, 1979). Os mecanismos moleculares que estão associados com estes efeitos farmacológicos não estão elucidados, entretanto, sabe-se que as toxinas agem através de três fases sucessivas: um efeito depressor, seguido por uma breve facilitação da liberação do transmissor e então por uma ação inibitória irreversível (CHANG, 1985; HARVEY, 1990 e DOLLY, 1992). Esse efeito foi atribuído à atividade fosfolipásica do veneno (HORTNAGL & HANIN, 1992). Um terço dos pacientes apresentam ainda paralisia flácida dos músculos esqueléticos (JORGE & RIBEIRO, 1989).

b) Miotóxica: caracterizada por lesões de fibras musculares esqueléticas que liberam enzimas e mioglobina para o sangue e, posteriormente, para a urina. Ocorre mialgia generalizada e coloração marrom-escura da urina em razão da miólise e da liberação maciça de mioglobina. A mioglobina excretada na urina foi, inicialmente, interpretada como sendo hemoglobina e o veneno como possuindo atividade hemolítica *in vivo*. A execução de exames laboratoriais adequados, entretanto, não demonstrou a hemólise intravascular nos pacientes. A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise).

Como um resultado da miólise, há uma liberação de mioglobina e enzimas para a circulação sanguínea, podendo-se observar valores elevados de creatinaquinase (CK), desidrogenase láctica, transaminases glutâmico-oxaloacética e glutâmico pirúvica, além da aldolase.

Parece que o veneno apresenta uma ação seletiva nas fibras do tipo I e II da musculatura esquelética (CUPO et al, 1990). O veneno apresenta forte atividade miotóxica e baixa atividade hemorrágica e proteolítica (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985, MAGALHÃES et al., 1986; CUPO et al., 1988; GUTIÉRREZ et al., 1991).

c) Coagulante: esta atividade inicialmente foi atribuída a fenômenos sistêmicos, em casos graves, com choque (BRAZIL & VELLARD, 1928; ROSENFELD, 1959,1965,1976). Posteriormente, foi descrita afibrinogenemia, sem consumo de plaquetas (AMARAL et al, 1988), o que foi corroborado pelo encontro de incoagulabilidade sanguínea descrita em 40% dos pacientes (JORGE E RIBEIRO, 1988; BARRAVIERA, 1994). A ação coagulante do veneno, *in vitro*, é do tipo trombina, podendo provocar incoagulabilidade sanguínea através da depleção de fibrinogênio (NAHAS et al., 1964; RAW et al., 1986).

A existência de oligúria ou anúria e a elevação dos nitrogenados sanguíneos representam a expressão clínica e laboratorial da insuficiência renal aguda, principal causa da mortalidade dos pacientes (CARDOSO & BRANDO, 1993). AMORIM et al., 1951 descreveu, em cães inoculados experimentalmente, uma glomerulonefrite atribuída ao veneno. Outros órgãos como o fígado, também podem ser afetados nos acidentes severos (BARRAVIERA, 1991,1994).

O veneno de *C. d. terrificus* tem efeito tóxico sobre o sistema nervoso (VITAL-BRAZIL, 1972). As principais toxinas presentes nesse veneno incluem:

Crotamina (GONÇALVES & VIEIRA, 1950), Giroxina (BARRIO, 1961), Convulxina (PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, 1981) e Crotoxina (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938)

Cabe ressaltar que, diferentemente da maioria dos venenos das cascavéis, o veneno de *C. d. terrificus*, apresenta neurotoxicidade, miotoxicidade e efeitos nefrotóxicos, principalmente devido a alta concentração de crotoxina (ROSENFELD, 1971; AZEVEDO-MARQUES et al., 1987; GUTIÉRREZ, 1991).

O veneno de *C. d. terrificus*, a cascavel brasileira, por apresentar uma toxina principal (β neurotoxina) determinante da toxicidade e atividade enzimática do veneno, e que compõe mais de 60% do seu total (VITAL BRAZIL, 1972), tem sido alvo dos mais variados estudos, tanto pela necessidade de se compreender a ação dos venenos após o envenenamento, quanto pela necessidade de se desenvolver terapias médicas adequadas para o tratamento (HAWGOOD & BON, 1991).

Devido a sua prevalência e toxicidade, os efeitos apresentados pelo envenenamento crotálico se devem, em quase sua totalidade, à presença da crotoxina.

Crotoxina: em 1938, quando foi isolada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, e ainda quando submetida a estudos de difusão e ultracentrifugação por GRALÉN & SVEDBERG, no mesmo ano, e eletroforéticos (LI & FRAENKEL-CONRAT, 1942), a crotoxina se mostrou como uma substância homogênea, com ponto isoelétrico, $pI=4.7$.

Entretanto foram precisos quase vinte anos para que se descobrisse que a crotoxina era uma proteína hetero-dimérica (FRAENKEL-CONRAT & SINGER, 1956). A crotoxina compreende 2 subunidades não covalentemente ligadas: Fosfolipase (PLA_2) e crotapotina, que podem ser separadas por cromatografia de troca iônica na presença

de uréia (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971), sendo a dissociação reversível (RUBSAMEN et al., 1971).

As duas subunidades agem sinergisticamente: a PLA₂ sozinha é pouco tóxica e pode bloquear a transmissão neuromuscular como a crotoxina, embora maiores doses sejam requeridas para causar o mesmo efeito. A crotapotina é desprovida de toxicidade porém a combinação com a PLA₂ aumenta sua atividade farmacológica (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; CHANG & LEE, 1977; BON et al., 1979; CHOUMET et al., 1993; LI et al., 1994). as subunidades da crotoxina se combinam para reconstituir o complexo, com todas as propriedades da toxina nativa (RUBSAMEN et al., 1971 e HORST et al., 1972).

BREITHAUPT et al. (1974) separaram as duas subunidades e encontraram, no processo, que por redução e carboxiamidometilação, a crotapotina poderia ser separada em tres cadeias A, B e C. Eles também relataram que sobre evidências cromatográficas, a fração A poderia existir em duas formas A' e A'', mas a diferença entre as duas não pode ser identificada em termos de composição de amino-ácidos.

Comparando-se com a fosfolipase, a crotapotina é um polipeptídeo ácido, menor que a fosfolipase e não é uma enzima ativa, apresenta peso molecular (PM) de 9000 e $pI=3,4$. A análise de aminoácidos das três frações originadas à partir da redução das pontes dissulfeto indicou que a cadeia A possuía 40 resíduos (PM=4300), B, 34 resíduos (PM=3700) e C, 14 resíduos (PM=1600). O complexo continha então 88 resíduos dos quais 14 eram meia cistinas (AIRD et al., 1985, 1990). Estes autores ainda sugeriram que a crotapotina poderia ser derivada de um precursor da fosfolipase, o que veio a ser confirmado por BOUCHIER et al., 1991 e FAURE et al., 1991, que relataram ser a crotapotina homóloga à fosfolipase, da qual tres peptídeos seriam

removidos durante um processo pos-translacional. FAURE et al., 1994 mostraram ainda a expressão de diferentes RNAs mensageiros presentes numa mesma serpente.

Embora tenha sido mostrado que a crotapotina é derivada de uma sequência precursora da PLA₂, somente esta última apresenta atividade enzimática (AIRD et al., 1985) que rompe a membrana celular e é responsável pela liberação de acetilcolina do córtex cerebral (ARAUJO et al., 1992).

BREITHAUPT et al., 1974, 1975 e AIRD & KAISER, 1985, relataram a possível existência de múltiplas isoformas tanto para crotapotina quanto para fosfolipase. Em 1987, FAURE & BON, através de técnicas cromatográficas e eletroforéticas, evidenciaram que existem pelo menos 15 isoformas de crotoxina e que a heterogeneidade das isoformas é tão grande em algumas amostras de veneno de uma mesma espécie de serpente quanto de uma mistura de amostra de várias espécies.

A crotoxina então é uma mistura de variantes (FAURE & BON, 1987) derivadas da combinação das isoformas das subunidades ((FAURE & BON, 1988 e FAURE et al., 1993).

As isoformas da crotapotina consistem de tres cadeias polipeptídicas (α , β , γ) ligadas por pontes dissulfeto resultantes de diferentes clivagens proteolíticas de um único precursor pro-crotapotina que foi identificado à partir do seu cDNA (FAURE et al., 1991, 1994 e BOUCHIER et al., 1991).

A toxicidade de várias isoformas mostrou estar relacionada com a afinidade entre as subunidades (FAURE et al., 1993). Complexos que se dissociam facilmente são menos tóxicos do que aqueles com alta constante de afinidade

Experimentos iniciais de ligação saturada, demonstraram a ligação da crotoxina à membrana de sinaptossomos de cérebro de mamíferos (HSEU, 1990; DEGN et al., 1991 e TZENG, 1993) e membranas pós-sinápticas de órgãos de Torpedo elétrico (BON et al., 1979). Nestes modelos, assim como em células vermelhas do sangue (JENG et al., 1978) e vesículas de fosfolipídeos (RADVANYI et al., 1989^B), a crotapotina se comporta como carreadora para a PLA₂, prevenindo ligações inespecíficas (JENG et al., 1978). Sobre membranas de Torpedo, como nos modelos citados anteriormente, a PLA₂ foi a principal espécie ligada à membrana enquanto que a crotapotina permaneceu em solução, indicando que há dissociação do complexo crotoxina após a interação com a membrana (FAURE et al., 1991).

RADVANYI et al., 1989^B, mostraram que fosfolipídeos carregados negativamente são componentes importantes do alvo da crotoxina

BOUSQUET et al., 1991, mostraram que a PLA₂ é internalizada, pelo menos em parte, e tanto a ligação à membrana como a internalização é aumentada pela crotapotina. Entretanto, SIMPSON et al., 1993 ressaltam que, diferentemente das mais potentes toxinas que são enzimas, as neurotoxinas compostas por PLA₂ não são endocitadas para exercer os seus efeitos. Ao contrário, essas toxinas se ligam à superfície das células e então sofrem um rearranjo molecular que lhes dá acesso ao substrato da membrana. Os dados obtidos por CARDI et al., 1992, corroboram os dados de BOUSQUET et al.

Segundo STRONG et al., 1990, a ligação da crotoxina é dependente de canais de potássio. Segundo HSEU et al., 1990, uma proteína de 85000 é o maior componente responsável pela ligação e uma outra de 45000 presente especificamente

em membranas neuronais é uma importante molécula responsável pela ligação da crotoxina (YEN & TSENG, 1991).

Estudos imunológicos utilizando anticorpos obtidos contra crotapotina e fosfolipase purificadas, têm sido especialmente interessantes na exploração de diferenças e similaridades entre as duas subunidades.

A combinação de uma cadeia mais básica com uma menos básica ou ácida suprime atividade fosfolipásica e aumenta a toxicidade (FOHLMAN et al., 1976; MARLAS & BON, 1982; KOUYOUUMDJIAN et al., 1986).

CARDI et al., 1992, mostraram a crotoxina ligada ao músculo esquelético através de detecção imunohistoquímica, com subsequente degeneração das junções neuro-musculares.

Tem sido sugerido, conforme já citado, que a crotapotina, subunidade não tóxica da crotoxina, age como carreadora para a fosfolipase, aguçando a especificidade e aumentando a estabilidade da proteína, sendo capaz de aumentar a ação biológica da fosfolipase (HABERMANN & BREITHAUPT, 1978 e YANG, 1994).

A estabilidade da interação entre crotapotina e fosfolipase no complexo tem grande importância na toxicidade da crotoxina (FAURE et al., 1993). DÉLOT & BON, 1993 sugeriram que a crotapotina se envolveria, temporariamente na ligação da crotoxina com seu acceptor de membrana, fato confirmado por BON et al., 1994, que mostraram que a crotapotina participa com a fosfolipase A_2 para a formação de um complexo ternário com o sítio acceptor da crotoxina, antes da liberação da crotapotina.

Considerando-se que a essência do conceito de carreadora é de que a subunidade não tóxica do complexo direciona as subunidades mais tóxicas, por

prevenir ligações inespecíficas do complexo, é um pré-requisito que o complexo permaneça intacto após a sua inoculação no corpo. É também essencial que o sítio de ligação da subunidade ativa não esteja envolvido na ligação das duas subunidades e que o complexo devesse se dissociar tão logo a subunidade ativa encontrasse o substrato.

As fosfolipases podem ser divididas em dois grupos principais: o primeiro inclui enzimas com forte atividade anticoagulante e alto poder de penetração em monocamadas de fosfatidilcolina bem compactadas. O segundo inclui enzimas não anticoagulantes que exibem propriedades opostas (OUYANG et al, 1992).

A fosfolipase hidrolisa a ligação 2-acil-éster do 3-sn-fosfolipideo (SLOTBOOM, 1982) e é composta de uma cadeia simples de 122 resíduos de aminoácidos (pm=14000), segundo AIRD et al., 1986.

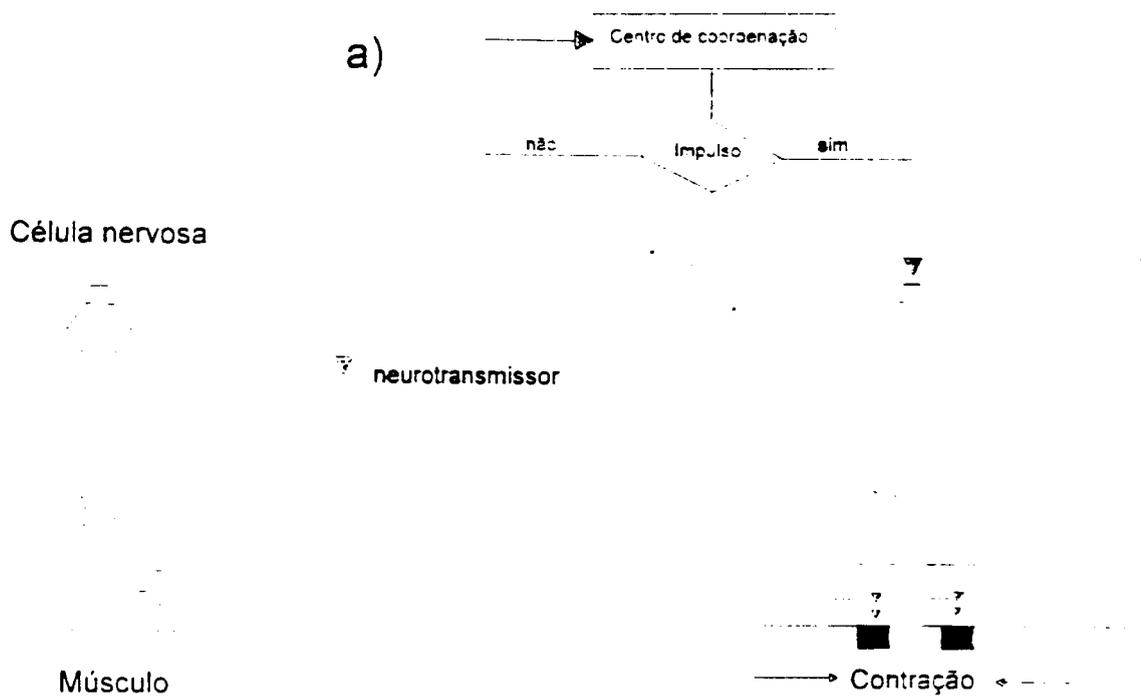
A crotoxina reduz a corrente de Na^+ e diminui o mecanismo de repolarização (ARAUJO & BEIRÃO, 1993) e, quando alquilada, tem sua atividade fosfolipásica e tóxica bloqueadas. A atividade enzimática é totalmente dependente da presença de íons cálcio (SHINA et al., 1990) e de outros cations divalentes (Sr^{2+} , Cd^{2+} e Ba^{2+}) além de íons trivalentes da família dos lantanídeos.(RADVANYI et al., 1989). A substituição de Sr^{2+} por Ca^{2+} causa acentuada redução da sua atividade fosfolipásica e inibe o bloqueio neuromuscular (CHANG & LEE, 1977 e HAWGOOD et al., 1988). Entretanto a comparação entre várias PLA_2 tóxicas e não tóxicas não mostrou relação direta entre atividade fosfolipásica e atividade neurotóxica (ROSENBERG, 1986).

A primeira fase do bloqueio neuromuscular parece ser independente da atividade fosfolipásica (CHANG & LEE, 1977; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1990 e HAWGOOD & BON, 1991).

A crotoxina age segundo três fases sucessivas: um efeito depressor seguido por uma breve facilitação da liberação do transmissor e então por uma ação inibitória irreversível (CHANG, 1985), como descrito para o veneno total.

Um esquema mostrando a ação pré- e pós-sináptica da crotoxina pode ser visto na Figura 1.(*FIG.1*)

Embora esta neurotoxina tenha ação principalmente sobre membranas pré-sinápticas, ela também exerce efeito pós-sináptico sobre receptores nicotínicos (BON, et al., 1979). As neurotoxinas pós-sinápticas formam um complexo com o receptor de acetilcolina que impede a ligação da mesma, levando à paralisia do músculo. TU, 1993, através de observações espectroscópicas mostrou que o resíduo de triptofano é mudado enquanto que a região da tirosina não sofre qualquer mudança durante a ação da toxina.



b)

c)

Figura 1. Ação das neurotoxinas de serpentes. (a) Transmissão normal do impulso nervoso; (b) Neurotoxinas de ação pré-sináptica; (c) Neurotoxinas de ação pós-sináptica.

A PLA₂ é cerca de dez vezes menos tóxica que a crotoxina (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN et al., 1971 e CHANG & SU, 1978) entretanto LLORET & MORENO, 1993, observaram que esta enzima exerceu efeito inflamatório quando testada em ratos. HAWGOOD & BON, 1991 sugeriram que a atividade fosfolipásica é condição necessária para a ação farmacológica, enquanto que CONDREA et al., 1981 e KINI & EVANS, 1989 mostraram a dissociação entre atividade farmacológica e enzimática. YANG, 1994 reforça esta última hipótese, propondo que existem dois sítios distintos que talvez se sobreponham com His-48 e Asp-49 estando no sítio catalítico e His-48 e lisina estando na região farmacologicamente ativa. A toxicidade da PLA₂ pura pode ser devida a um efeito direto não enzimático.

Os mecanismos de ação da crotoxina são ainda pouco compreendidos, entretanto uma variedade de efeitos tem sido descrita, incluindo:

- a) capacidade de bloquear a liberação de acetilcolina das terminações nervosas;
- b) atividade pos sináptica;
- c) ação miotóxica.

Atividades hipnótica e ansiogênica têm ainda sido descritas por VASSILIEFF et al (1995), baseadas em estudos comportamentais em ratos.

Muito se tem estudado para se identificar o sítio tóxico da molécula, ou seja, os aminoácidos importantes para a sua toxicidade. CURIN-SERBEC et al., 1994 concluíram que a porção C-terminal da fosfolipase, domínio mais imunogênico presente na enzima, é importante para a atividade farmacológica da crotoxina, parecendo estar envolvida na liberação da acetilcolina, pois quando a PLA₂ ou a crotoxina estavam na

presença de anticorpos anti-peptídeos, que incluíam C-terminal, houve inibição da liberação do neuro-transmissor.

Entretanto, como anticorpos anti porção C-terminal reagem fracamente com a crotoxina, sugerindo que este domínio é mascarado no complexo ou que a fosfolipase sofre uma mudança conformacional quando da interação com a crotapotina.

Diferentes esquemas de imunização têm sido testados e até mesmo a busca de fatores que neutralizem a potencia letal da crotoxina, em particular, têm sido tentados (FORTES-DIAS et al., 1994), com o intuito de melhorar a eficácia dos antivenenos. Entretanto os resultados obtidos não têm sido completamente satisfatórios (FREITAS et al., 1991)

Têm sido propostos esquemas de imunização utilizando a fração principal do veneno de cascavel (crotoxina), ou mesmo a sua subunidade enzimática (PLA₂), na tentativa de se obter anti-soros (HIGASHI et al., 1989^a; FREITAS et al., 1990 e DOS SANTOS et al., 1988).

Dentre os vários estudos que se tem feito sobre a crotoxina, aqueles que abordam as propriedades imunológicas têm crescido sobremaneira, tanto utilizando o complexo como um todo, quanto suas subunidades isoladamente (HANASHIRO et al., 1978; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1981; KAISER et al., 1986 e CHOUMET et al., 1989). Estes dois últimos grupos sugeriram que:

- a) a crotapotina é mais fraco imunógeno que a PLA₂
- b) anticorpos anti-PLA₂ reconhecem a subunidade básica mas não reconhecem ou dificilmente reconhecem a subunidade ácida.; e esses anticorpos neutralizam a crotoxina com maior eficiência que os anticorpos anti-crotoxina.
- c) anticorpos anti-subunidade ácida se ligam às duas subunidades isoladas.

A possibilidade de destoxicação de venenos para preparação de anti-toxinas por radiação gama tem recebido crescente atenção. Estudos envolvendo venenos de serpentes, que compoem potentes toxinas, têm implicações importantes uma vez que as mortes à partir de picadas de serpentes em áreas tropicais são ainda comuns.

Devido ao grande número de pesquisas que buscam esclarecer os mecanismos imunológicos que cercam as toxinas, com o intuito de aprimorar a produção de soros anti-ofídicos, e considerando que a radiação ionizante se mostrou extremamente eficiente atenuando a toxicidade da crotoxina sem perda da sua capacidade de gerar anticorpos neutralizantes, um estudo mais aprofundado sobre os produtos originários da irradiação desta toxina faz-se necessário.

I - OBJETIVO

Estudar as propriedades da crotoxina irradiada e os produtos formados durante a irradiação desta toxina visando a obtenção de um imunógeno ideal, através do isolamento e caracterização bioquímica e imunológica dos mesmos.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados em nossos experimentos foram de qualidade pró-análise, sendo a água, utilizada no preparo das soluções, bidestilada em aparelho de vidro. O veneno crotálico sob a forma cristalizada, foi fornecido pelo Instituto Butantan, de São Paulo. As membranas de diálise utilizadas (SPECTRAPOR) apresentavam uma capacidade de exclusão de proteínas maiores que 3500 ou 12000. Outros reagentes e "Kits" específicos adquiridos comercialmente terão sua fonte citada no texto. Os animais utilizados foram obtidos da colônia mantida pelo biotério do IPEN ou da colônia da Universidade de Wyoming (USA), sendo sempre mantidos em gaiolas e meios absorventes autoclavados, com trocas frequentes. Recebiam sempre alimentação comercial adequada e água *ad libitum*.

MÉTODOS

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes e dois *pools* diferentes de venenos foram submetidos a todos os testes.

III.1- Irradiação das proteínas

As proteínas, em uma concentração, determinada pelo método de BRADFORD (1976), de 2 mg/ml em solução salina acidificada, foram irradiadas com 2000 Gy NASCIMENTO (1991), utilizando raios gama oriundos de uma fonte de ^{60}Co (Gamma Cell 220, Atomic Energy of Canada Ltd). O processo de irradiação ocorreu na presença

de oxigênio, à temperatura ambiente, com taxa de dose de $5,54 \times 10^2$ Gy/h. Após o processo de irradiação, as amostras foram dialisadas exaustivamente contra água e liofilizadas a seguir.

III.2- Isolamento da crotoxina à partir do veneno total:

a) Cromatografia de exclusão molecular

Veneno total de *C. d. terrificus*, na forma cristalizada, foi submetido a cromatografia de exclusão molecular, usando um sistema não denaturante, como o empregado por ROGERO (1978), com pequenas modificações.

Em cada cromatografia foram dissolvidos 150 mg do veneno total em 4,0 ml de ácido acético 0,1 M pH 3,0. A suspensão foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C; reservou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 2,0 ml do mesmo tampão e centrifugado novamente sob as mesmas condições. Os dois sobrenadantes, reunidos e homogeneizados, foram submetidos a cromatografia em gel de Sephadex G-75, de acordo com FAURE & BON (1988), em uma coluna de 80 x 2,5 cm, mantida a 4°C e equilibrada com tampão ácido acético 0,1 M pH 3,0 com fluxo médio de 12 ml/h. A amostra contendo o veneno total num volume máximo de 6,0 ml foi aplicada à coluna e frações de 2,0 ml cada foram colhidas em coletor automático de frações (Pharmacia - Frac-200), com determinação contínua da absorvância a 280 nm (Rec-101). As absorvâncias das frações foram redeterminadas em 280 nm, em cubeta de quartzo de 1,0 cm de trajeto em um espectrofotômetro Zeiss PMQ-II. As frações contendo o principal pico, que eluiu na posição correspondente à crotoxina, foram reunidas e liofilizadas. Opcionalmente, foi utilizado um segundo meio de exclusão molecular,

Sephacryl S-200, que foi empregado seguindo a metodologia descrita por AIRD & KAISER (1985), que apresenta pequenas modificações daquela descrita acima.

b) Cromatografia em resina de troca iônica

A crotoxina liofilizada, semipurificada por exclusão molecular, foi ressuspensa em tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,3 e aplicada em uma coluna de resina aniônica Mono Q, em um sistema FPLC (Fluid Pressure Liquid Chromatograph), previamente estabilizada no mesmo tampão. Após adsorção e lavagem, a crotoxina ligada foi eluída pela passagem de um gradiente linear de NaCl, 0 a 0,5 M no mesmo tampão. A absorvância, a 280 nm, foi determinada de maneira semelhante ao procedimento anterior. As frações contendo a crotoxina foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água e novamente liofilizadas.

III.3- Isolamento de agregados formados durante a irradiação

A crotoxina irradiada, 15 mg em 2,0 ml, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100, em uma coluna de 98,0 x 3,0 cm, estabilizada e eluída com tampão de ácido acético 0,1 M pH 3,0. A absorvância das proteínas foi determinada constantemente, à 280 nm, por espectrofotometria de fluxo em UVICORD II, e foram colhidas frações de 1,8 ml/tubo. As absorvâncias das frações foram redeterminadas em um espectrofotômetro Zeiss PMQ-II, conforme descrito anteriormente. Os tubos selecionados foram reunidos, dialisados contra água e liofilizados.

III.4- Purificação das subunidades

a) Subunidade ácida:

Foram dissolvidos 7 mg de crotoxina, irradiada ou não, em 2 ml de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,2, contendo 6 M de uréia. Após filtração em membrana de poro de 0,22 μ m, o volume foi aplicado numa coluna aniônica, do tipo Mono Q, de 5,0 x 0,5 cm, num sistema de cromatografia rápida (FPLC), em um fluxo de 60 ml/h. Depois da lavagem da coluna com o mesmo tampão, foi feita a eluição, aplicando-se um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,3 M em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,2. A absorvância a 280 nm foi determinada como anteriormente descrito para o sistema de exclusão molecular.

b) Subunidade básica:

Foram dissolvidos 7 mg de crotoxina, irradiada ou não, em 2 ml de tampão HEPES 50 mM pH 8,0 contendo 6 M de uréia, e aplicados em coluna Mono S (FPLC) de 5,0 x 0,5 cm, equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem, foi aplicado um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M em tampão HEPES 50 mM pH 8,0. A absorvância a 280 nm foi determinada seguindo os protocolos utilizados anteriormente.

III.5- Análise por eletroforese em SDS-PAGE

A análise de purificação das frações foi efetuada em sistema descontínuo de eletroforese em camada vertical de poliacrilamida, em condições de desnaturação, na presença de 0,1% de SDS (Sodium Dodecil Phosphate), segundo AIRD & KAISER (1986). As amostras contendo, em média, 10 μ g de proteína foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris/HCl 0,08 M pH 6,8, EDTA 2 mM, SDS 100 mM e Azul de bromofenol, sendo a seguir fervidas em banho maria por 5 minutos. O gel de resolução apresentava uma concentração de acrilamida de 15% em tampão Tris/HCl

0,3 M pH 8,8, enquanto o gel de empilhamento apresentava uma concentração de 4,4%, em tampão Tris/HCl 0,1 M pH 6,8. O tampão utilizado para a corrida continha Tris 0,025 M, Glicina 0,2 M, pH 9,4. Após a corrida a uma voltagem constante de 120 V e 34 mA, o gel foi corado por coloração comercial de prata (Silver stain, GELCODE). Foram utilizados padrões de peso molecular contendo lisozima (14,4 K), Inibidor de Tripsina de soja (21,5 K), ovalbumina (45K), albumina bovina (66,2K), fosforilase B (92 k) e β -galactosidase (116 K). Quando havia a necessidade de destruição das pontes dissulfeto era adicionado DTT (ditiotreitól) ao tampão da amostra.

III.6- Determinação da atividade tóxica

A toxina liofilizada foi dissolvida em salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 0,1% de albumina bovina, pH 7,1. As diluições das toxinas foram progressivas, utilizando um fator 1,3 para a progressão. A solução estoque para injeção de cada toxina foi preparada de forma que o volume, em μ l, injetado por camundongo, fosse exatamente 10 vezes o peso do animal em gramas. A injeção sempre foi feita endovenosamente, em uma das veias dorso-laterais da cauda dos animais, cujos pesos variavam entre 20 e 40 g. Os animais eram colocados previamente em uma estufa a 37°C, para induzir uma venodilatação cutânea. Após a injeção, cada animal foi verificado para determinação de eventuais extravazamentos da toxina injetada, no sítio de injeção.

A mortalidade dos animais foi acompanhada por 24 h., nos grupos constantes de quatro animais que foram utilizados para cada dose. A determinação da dose letal 50% foi feita utilizando-se o método de Spearman-Karber (WHO, 1980).

III.7- Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada utilizando-se como substrato a L- α -fosfatidilcolina, de gema de ovo, e a produção de ácidos graxos foi titulada com NaOH 0,04 M, sob nitrogênio, a 37°C, sem sistemas tampões no meio. O equipamento utilizado foi um potenciômetro automático RADIOMETER PHM 82, equipado com titulador TTT-80. O substrato foi preparado dissolvendo-se 90 mg de L- α -fosfatidilcolina, seco sob nitrogênio, em 9,0 ml de Triton X-100, 12,5 M, com o auxílio de um disruptor ultrassônico de células (VIRTIS).

Após homogeneização da solução, 1 ml de CaCl₂ 0,1 M, foi adicionado e sucedeu-se nova homogeneização por sonicação, resultando uma concentração molar de 2:1 de detergente/fosfolípido. Para a determinação da atividade fosfolipásica, 20 μ l contendo 1,25 μ g de proteína a ser testada foram adicionados a esta solução, e acompanhou-se a variação do pH por 20 min. A atividade foi expressa em μ moles de ácidos graxos liberados por mg de proteína por minuto.

III.8- Produção de anticorpos

Para os ensaios de imunização, foram utilizados camundongos machos, pesando entre 20 e 40 g, com colheita prévia de soro para controle. O agregado ou a crotoxina irradiada sem o agregado (CISA) foram utilizados como antígenos, sendo dissolvidos em PBS e emulsificados com igual volume de adjuvante completo de Freund, tal que 5 μ g de proteína foram injetados intradermicamente em um volume final de 200 μ l, em quatro diferentes locais do dorso do animal. Após uma semana, igual quantidade de antígeno foi preparada em alúmen e injetada nos animais usando o mesmo

procedimento descrito anteriormente. Passados 21 dias do inóculo inicial, foi feito novo inóculo utilizando-se o alumen, uma vez mais, como adjuvante.

Semanalmente, à partir do primeiro inóculo, os animais foram sangrados e, após separação do soro, a presença dos anticorpos séricos, contra os antígenos inoculados, foi pesquisada em um sistema imunoenzimático. Após seis semanas do início da imunização, foi testada *in vivo*, a eficiência dos anticorpos formados, por injeção intraperitoneal de 15 ou 46 DL₅₀ da toxina não irradiada.

III.9- Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Esta metodologia foi utilizada em duas ocasiões:

a) Para acompanhar e titular possíveis anticorpos formados durante o processo de imunização descrito no item (8):

Para tanto, o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foi feito em microplacas (IMMUNOLON II), às quais era adsorvida a crotoxina purificada, 100 µl por poço, em uma concentração de 1 µg/ml, em tampão carbonato pH 9,6 por 18h. a 4°C. Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,5% de Tween 20, eventuais sítios de ligação foram bloqueados com gelatina 1% em PBS, por 1 h. à temperatura ambiente. Seguindo a fase de lavagem acima descrita, o anti-soro a ser testado foi diluído seriadamente de 1/600 até 1/614400, em base 1/2, adicionado às placas e incubado por 1 h. à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o conjugado de peroxidase com IgG (imunoglobulina do tipo G) de camundongo, diluído a 1/1000 em tampão de lavagem, foi adicionado e incubado por 2 h. à temperatura ambiente. As lavagens finais foram seguidas pela adição de cromógeno ABTS (ácido sulfônico - 2,2-azinobis - 3-etilbenzotiazolina), 1 mg/ml em ácido cítrico 50 mM pH 4.0, contendo 0,03% de H₂O₂

adicionado na hora do uso. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de SDS 10% por poço e a absorvância, a 414 nm, foi determinada em um leitor de microplacas.

b) Para testar a reatividade das toxinas irradiadas ou não com anticorpos monoclonais anti-PLA₂.

As placas foram sensibilizadas com as toxinas ou com os anticorpos monoclonais exatamente como descrito acima. O segundo componente do *sanduíche* foi colocado em uma concentração de 2 µg/ml com diluições seriadas subsequentes. Esta etapa foi seguida pela adição de anti-soro de coelho anti PLA₂ diluído 1/1000 com PBS e finalmente IgG de carneiro anti-coelho conjugado com peroxidase, diluído 1/1000 em tampão de lavagem. A coloração foi desenvolvida como descrita anteriormente.

III.10- Neutralização in vivo

Os animais utilizados para a imunização com agregados ou crotoxina irradiada sem agregados (CISA), após seis semanas do início do processo, foram desafiados com injeção, intraperitoneal, com 15 ou 46 DL₅₀ de crotoxina não irradiada.

III.11- Neutralização in vitro

Para este experimento foram utilizados camundongos machos pesando entre 20 e 25g. Diferentes concentrações de crotoxina foram obtidas à partir de diluições progressivas, sendo 1500 µg/g de animal o valor máximo utilizado. De cada dose, foram tomados 100 µl aos quais foram adicionados outros 100 µl agora do soro anti-agregado, diluído 1/10. Após um período de incubação de uma hora à temperatura ambiente, as amostras foram injetadas nos animais. Cada grupo continha quatro animais e a injeção de 200 µl, foi feita pela via intraperitoneal, seguindo o protocolo descrito por MIDDLEBROOK em 1991.

III.12-Dosagem sérica de creatinaquinase

Para a determinação da liberação de creatinaquinase (CK) pela ação da toxina, foram inoculados grupos de 3 fêmeas pesando cerca de 22 g, com toxinas diluídas em solução salina 0,15 M, com controles adequados, numa concentração de 5 µg/0,1ml usando-se a via intramuscular. Os animais foram sangrados em diferentes intervalos de tempo, pelo plexo retro-orbital e o sangue, mantido a 37°C por 30 minutos e então centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, para obtenção do soro.

Para o ensaio, os reagentes utilizados faziam parte do "kit" comercial da Sigma para dosagem de CK. Foram pipetados 0,1 ml do soro a ser testado, diluído 10 vezes em solução salina, e 0,5 ml de uma solução de fosfocreatina. Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C por 10 minutos e o início da reação foi obtido pela adição de 0,2 ml de solução ADP-Glutationa. Passados 30 minutos exatos, a reação foi interrompida adicionando-se, a cada tubo, 0,2 ml de solução de p-

hidroximercuribenzoato sob leve agitação. Adicionou-se ainda 1,0 ml de solução de α -naftol; 1,0 ml de solução de di-acetil e 7,0 ml de água, a cada tubo.

Os tubos foram homogeneizados, mantidos em banho maria a 37°C, por 20 minutos, para desenvolvimento da coloração e então centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi determinada a 520 nm, utilizando-se como controle um tubo que teve seu conteúdo em soro, substituído por diluente.

A atividade de creatinaquinase foi determinada à partir de uma curva de calibração construída com base em uma solução padrão de creatina. Dado que a creatina é produzida em quantidade proporcional à atividade de CK presente, a quantificação da atividade enzimática pode ser feita por este tipo de calibração. Uma unidade Sigma (U-SIGMA) é a atividade que fosforilará um μ mole de creatina por minuto a 25°C.

III.13- Mapa de peptídeos

Na tentativa de se determinar se as subunidades sofriam alguma alteração ao nível de resíduos de aminoácidos e quais deles participavam destas mudanças, foram feitos os mapas de peptídeos das duas subunidades, irradiadas ou não.

O primeiro passo foi a cromatografia de todas as amostras em coluna de FPLC C-18, para se obter o perfil que serviria de controle para as análises subsequentes. As características da coluna estão descritas nos itens subsequentes.

a) Redução e alquilação da subunidade básica

Depois de purificados e liofilizados, 2 mg de subunidade básica foram dissolvidos em 0,75 ml de hidrocloreto de guanidina 8 M. Adicionou-se à solução, 0,1 ml de Tris/HCl 1M pH 8,2; 0,1 ml de EDTA 50 mM ph 8,2 e 0,1 ml de DTT 0,24 M, que

correspondia a aproximadamente 6 vezes a concentração molar de resíduos de cisteína da proteína, que contém 7 pontes dissulfeto e peso molecular de 14 K. A mistura foi borbulhada com nitrogênio por 3 minutos e mantida sob agitação por 3 horas, em tubo selado. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados à solução, 0,2 ml de iodoacetamida 0,25 M, correspondentes a 2,1 vezes a concentração molar de DTT, e borbulhou-se nitrogênio por mais 1 minuto. Depois de selado, o tubo foi incubado por 1 h. a 27°C, na ausência de luz.

A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido acético glacial e a mistura foi dialisada em membrana de limite de exclusão de 2 K, contra ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % por 72 h., com trocas de banho à cada 24 h. O dialisado foi liofilizado e aliqotado.

b) Digestão e cromatografia da subunidade básica

A uma das alíquotas, mencionadas no procedimento anterior, que continha 333 µg de proteína alquilada, foram adicionados, sequencialmente, 40 µl de metanolamina/HCl 200 mM; 40 µl de tampão Tris 250 mM pH 8,5 contendo 10 mM de EDTA; 203 µl de água destilada e 50 µl de endoproteínase Lys-C (BOEHRINGER). A mistura foi mantida a 37°C por 18 h. e a seguir, cromatografada em uma coluna VIDAC C-18, usando TFA 0,1 % como tampão de eluição, em um sistema de cromatografia rápida, com monitoração automática da absorvância, a 214 nm.

c) Redução e alquilação da subunidade ácida

A subunidade ácida sofreu a redução e alquilação sob os mesmos critérios seguidos para a subunidade básica, entretanto, diante da impossibilidade de se submeter o material à diálise, devido ao baixo peso molecular de cada uma das 3 cadeias que a compõe, optou-se por um processo de dessalinização diferente da diálise. Assim, após a interrupção da reação com ácido acético glacial, o material foi submetido a uma cromatografia em coluna do tipo VIDAC C-18 (15 x 0,46 cm) utilizando-se o TFA 0,1 % contendo 75 % de acetonitrila, como tampão de eluição. Ao final da cromatografia, o eluente foi liofilizado.

14- Análise de aminoácidos

Foram selecionados os principais picos dos mapas de peptídeos das subunidades irradiadas e não irradiadas. A análise de aminoácidos dos principais picos apresentados nos mapas de peptídeos foi feita gentilmente por W. G., Kruggel, do Laboratório de Sequenciamento de aminoácidos da Universidade de Wyoming-USA.

IV - RESULTADOS

IV.1 - Purificações cromatográficas e irradiação das proteínas

Veneno total de *C. d. terrificus* foi, inicialmente, purificado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 ou em Sephacryl S-200, e revelou um componente tóxico representando aproximadamente 65% do material absorvido em 280 nm (**FIG. 2**) e que portanto foi identificado como sendo a crotoxina. Os tubos identificados no gráfico foram reunidos e liofilizados.

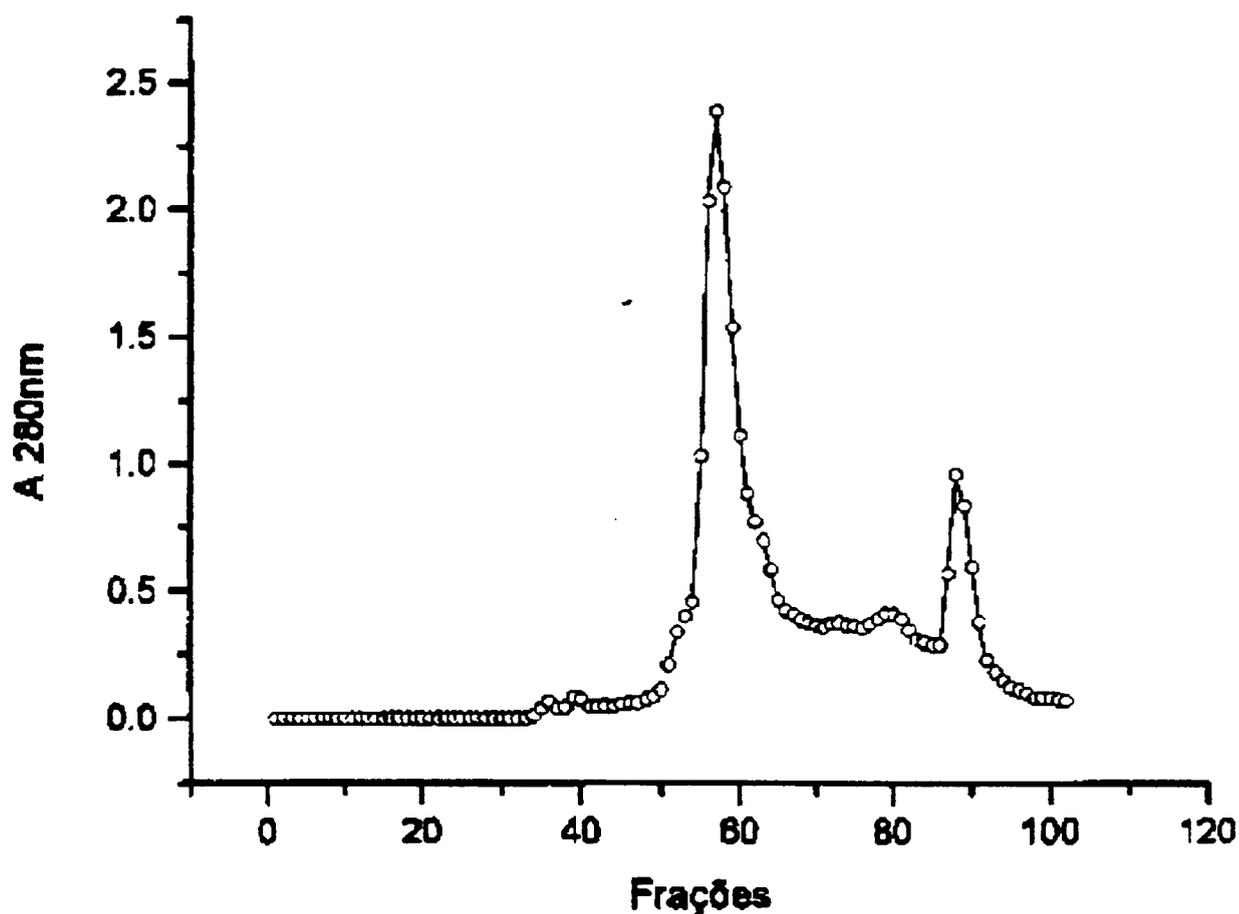


Figura 2 : Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 HR do veneno total de *C. d. terrificus*.

Uma segunda etapa de purificação da crotoxina envolveu nova cromatografia, entretanto, de troca iônica (aniônica) do tipo Mono Q.

Parte da crotoxina purificada foi utilizada para o isolamento das subunidades que a compõe (fosfolipase e crotapotina). Este isolamento foi feito baseado nas características de cada uma delas.

A subunidade básica, por ser repelida quando em contato com colunas do tipo Mono Q, carregadas positivamente, elui antes da aplicação do gradiente, enquanto que para a obtenção da subunidade ácida, foi necessário um aumento da força iônica para 0,25 M de NaCl (**FIG.3**).

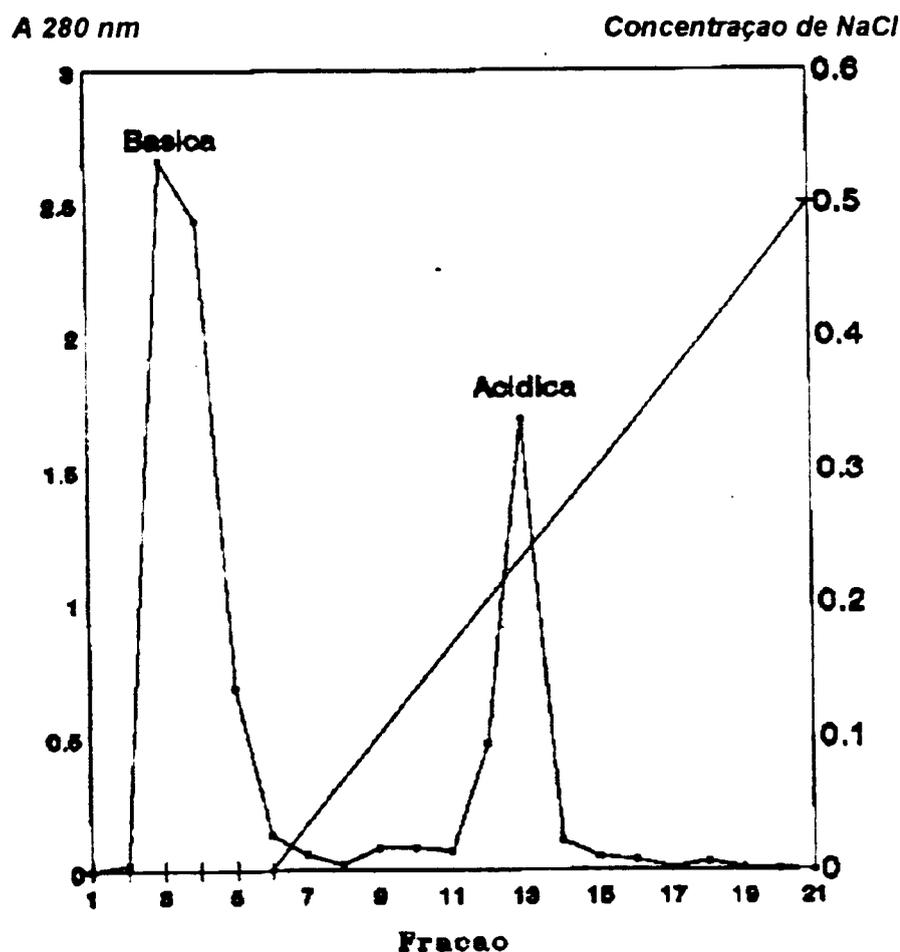


Figura 3: Cromatografia de troca iônica em coluna MONO-Q da crotoxina não irradiada

O complexo crotoxina, assim como suas subunidades isoladas, foram submetidas ao processo de irradiação, na dose de 2000 Gy, segundo o protocolo descrito em Métodos. Estas frações foram chamadas amostras irradiadas.

A crotoxina irradiada, foi submetida à cromatografia de troca iônica para o isolamento das subunidades (**FIG.4**), obedecendo o mesmo protocolo descrito para a crotoxina não irradiada

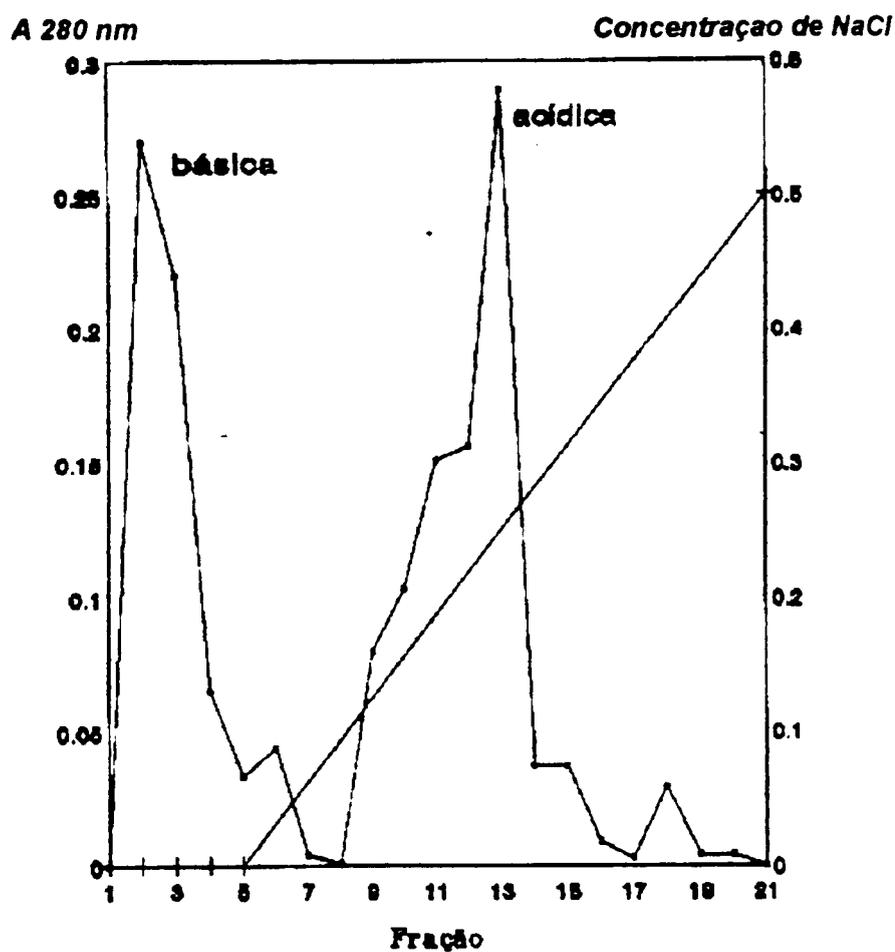


Figura 4: Cromatografia de troca iônica em coluna MONO-Q da crotoxina irradiada.

O isolamento dos agregados à partir da crotoxina irradiada, foi feito por cromatografia de exclusão molecular (**FIG. 5**).

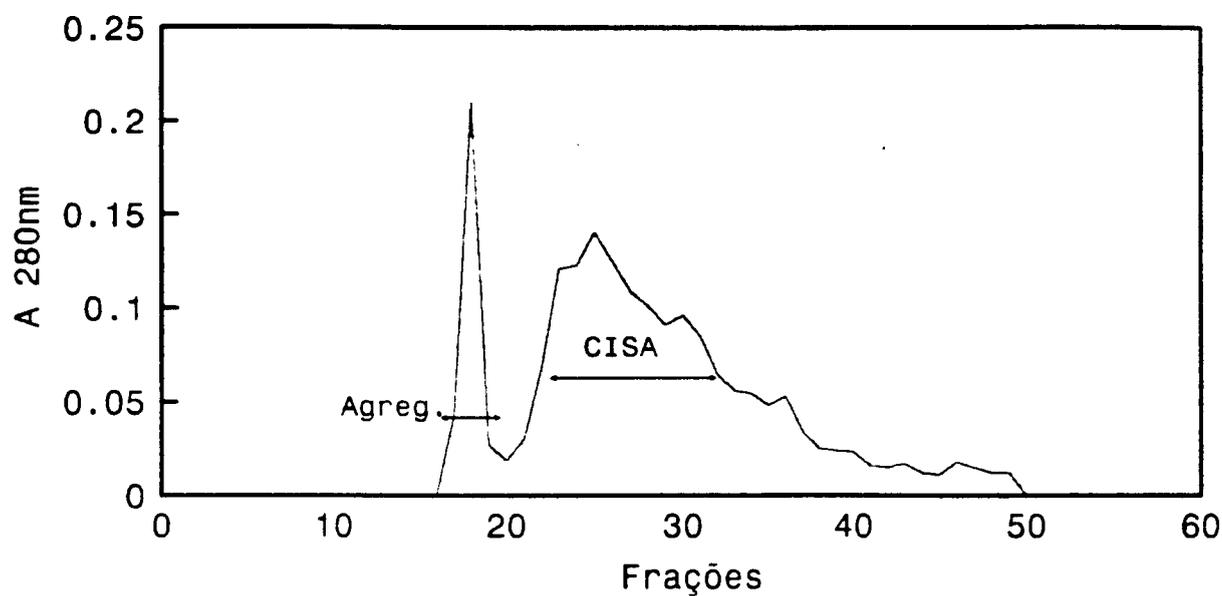
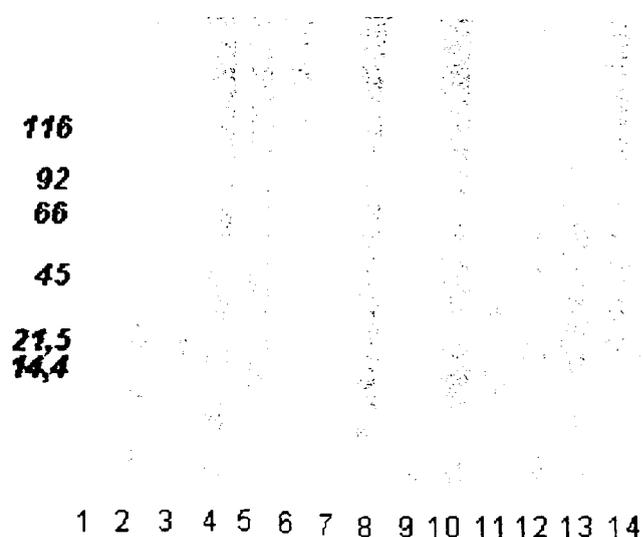


Figura 5: Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 HR de crotoxina irradiada.

O perfil cromatográfico mostra o aparecimento dos agregados, quando se compara o perfil obtido, nas mesmas condições, para a crotoxina nativa.

IV.2 - Eletroforese

A análise eletroforética das amostras, irradiadas ou não, foi feita em gel de poliacrilamida a 15%, e mostrou além da pureza da preparação da crotoxina, o aparecimento de bandas de maior peso molecular, caracterizando os agregados também observados na gel filtração, das proteínas submetidas ao processo de irradiação (**FIG.6**).



- 1; 11-Marcadores de peso molecular
- 2; 12-Veneno total
- 3-Crotoxina nativa
- 4; 13-Crotoxina irradiada
- 5; 14-Crotoxina irradiada sem agregados
- 6-Agregados
- 7-Fosfolipase nativa
- 8-Fosfolipase irradiada
- 9-Crotapotina nativa
- 10-Crotapotina irradiada

IV.3 - Atividade tóxica

O resultado da DL_{50} da crotoxina e suas subunidades, irradiadas ou não, assim como o produto das diferentes associações entre as subunidades está mostrado na **Tabela-1**. Ainda nesta tabela, pode-se ver os resultados oriundos da DL_{50} do agregado e da crotoxina irradiada sem o agregado (CISA).

A crotoxina, depois de submetida à irradiação, se mostra 2 vezes menos tóxica quando comparada com a toxina não irradiada, enquanto que a crotoxina irradiada sem o agregado (CISA), é tão tóxica quanto a não irradiada. Os agregados entretanto, até a dose testada, se mostraram desprovidos de qualquer toxicidade.

Usando-se associações entre as subunidades, constatou-se que nos casos onde a associação compreende subunidade básica irradiada com subunidade ácida não irradiada, ocorre um aumento da DL_{50} da ordem de 50% quando comparada com o resultado oriundo da associação entre as duas subunidades não irradiadas. Por outro lado, quando a associação envolveu as duas subunidades irradiadas, os resultados foram os mesmos daqueles apresentados quando apenas a subunidade básica era irradiada.

Tabela-1: DL₅₀ da crotoxina e suas subunidades, nativa ou irradiada e após reassociação das subunidades isoladas.

| Fração testada | DL ₅₀ (ug/g) |
|--|-------------------------|
| Crotoxina nativa | 0,06 |
| Crotoxina irradiada(*) | 0,11 |
| Crotoxina irradiada sem agregados | 0,06 |
| Agregados | >2,5 |
| Subunidade básica nativa (PLA ₂) (B) | 0,6 |
| Subunidade básica irradiada (PLA ₂) (B*) | >2,5 |
| Subunidade ácida nativa (A) | >2,5 |
| A + B | 0,08 |
| A* + B | 0,11 |
| A + B* | 0,22 |
| A* + B* | 0,22 |

IV.4 - Atividade fosfolipásica

Os resultados dos testes, mostrados na **Tabela-2**, revelaram que a atividade fosfolipásica apresentada pela crotoxina irradiada representa a metade do valor da atividade da crotoxina não irradiada, enquanto que a CISA apresenta atividade idêntica à da toxina não irradiada.

Quando foram testadas as atividades dos produtos das diferentes associações entre as subunidades, observou-se que tanto a associação entre as duas subunidades não irradiadas como aquela envolvendo a subunidade ácida irradiada, apresentaram os mesmos resultados do complexo crotoxina não irradiado.

A subunidade básica apresentou alta atividade enquanto que a subunidade ácida e os agregados não apresentaram qualquer atividade fosfolipásica.

Tabela-2: Atividade fosfolipásica da crotoxina e suas subunidades, nativa ou após irradiação e reassociação de subunidades.

| Fração testada | Atividade PLA ₂ (μmoles/min/mg) |
|--|--|
| Crotoxina nativa | 84 |
| Crotoxina irradiada(*) | 39,5 |
| Crotoxina irradiada sem agregados | 90 |
| Agregados | 0 |
| Subunidade básica nativa(PLA ₂) (B) | 330 |
| Subunidade básica irradiada(PLA ₂) (B*) | 17 |
| Subunidade ácida nativa (A) | 0 |
| A + B | 49,5 |
| A* + B | 49,5 |
| A + B* | 20,25 |
| A* + B* | 2,92 |

IV.5 - Atividade de creatinaquinase

Conforme pode ser visto na figura (FIG.7), a subunidade básica não irradiada, assim como a CISA, apresentaram alta atividade de creatinaquinase seguidas, em ordem decrescente, pela crotoxina não irradiada, crotoxina e subunidade básica irradiadas.

A atividade de creatinaquinase apresentada pelos agregados foi semelhante àquela apresentada pelo controle que não recebeu toxina.

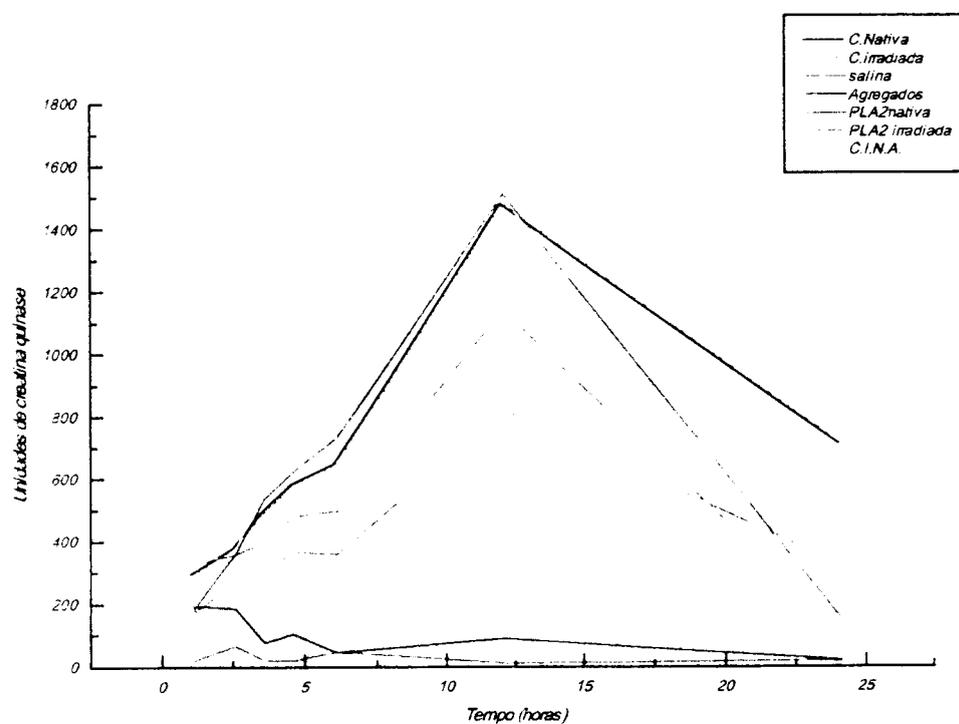


Figura 7: Níveis séricos de creatinaquinase em função do tempo após injeção das toxinas

IV.6 - Produção de anticorpos

Agregado e CISA, induziram, separadamente, à formação de anticorpos em camundongos e ambos reconheceram a crotoxina não irradiada quando testados através de um ensaio imunoenzimático (FIG. 8).

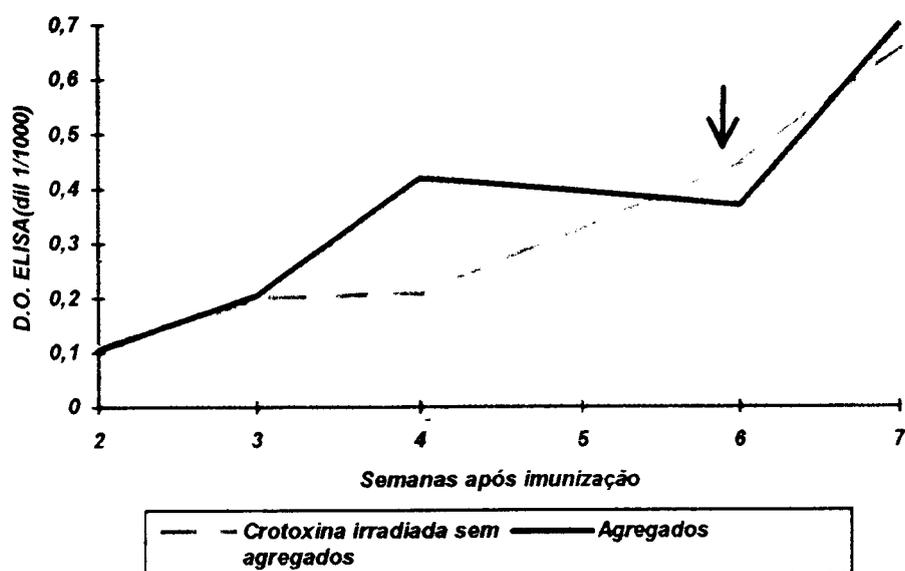


Figura 8: Produção de anticorpos contra crotoxina induzidas por agregados e crotoxina irradiada sem agregados.

IV.7 - Neutralização *in vivo*

Os animais usados durante o processo de imunização foram ainda desafiados com 15 ou 46 DL₅₀ de crotoxina não irradiada por via intraperitoneal.

Os animais imunizados com CISA suportaram 15 DL₅₀ da crotoxina não irradiada, entretanto, quando foram usadas 46 DL₅₀ para o desafio, apenas dois, dos quatro animais testados, sobreviveram.

Para os animais imunizados com os agregados, um, entre quatro, morreu quando desafiado com 15 DL₅₀ de crotoxina não irradiada; entretanto, animais imunizados com tais agregados, não suportaram o desafio com 46 DL₅₀ da toxina não irradiada.

IV.8 - Neutralização *in vitro*

Os camundongos que receberam as misturas compostas de diferentes concentrações da toxina e soro anti-agregado puderam suportar até 9 DL₅₀ da toxina nativa (**Tabela-3**)

Tabela-3: Poder neutralizante dos anticorpos anti-agregados frente à toxina não irradiada

| No. de animais | Crotoxina nativa ($\mu\text{g/g}$) | Mortalidade |
|----------------|---|-------------|
| 4 | 0,90 (15 DL ₅₀) | 4 |
| 4 | 0,54 (9 DL ₅₀) | 1 |
| 4 | 0,30 (5 DL ₅₀) | 0 |
| 4 | 0,18 (3 DL ₅₀) | 0 |
| 4 | 0,10 (1,5 DL ₅₀) | 0 |
| 4 | 0,06 (1 DL ₅₀) | 0 |

IV.9 - Ensaio com anticorpos monoclonais

O complexo crotoxina ou apenas sua subunidade básica, irradiados ou não, assim como CISA e agregados, foram testados contra diferentes anticorpos monoclonais (tipos 1, 2, 5 e 11) anti-subunidade básica e os resultados estão apresentados na figura seguinte (**FIG.10**)

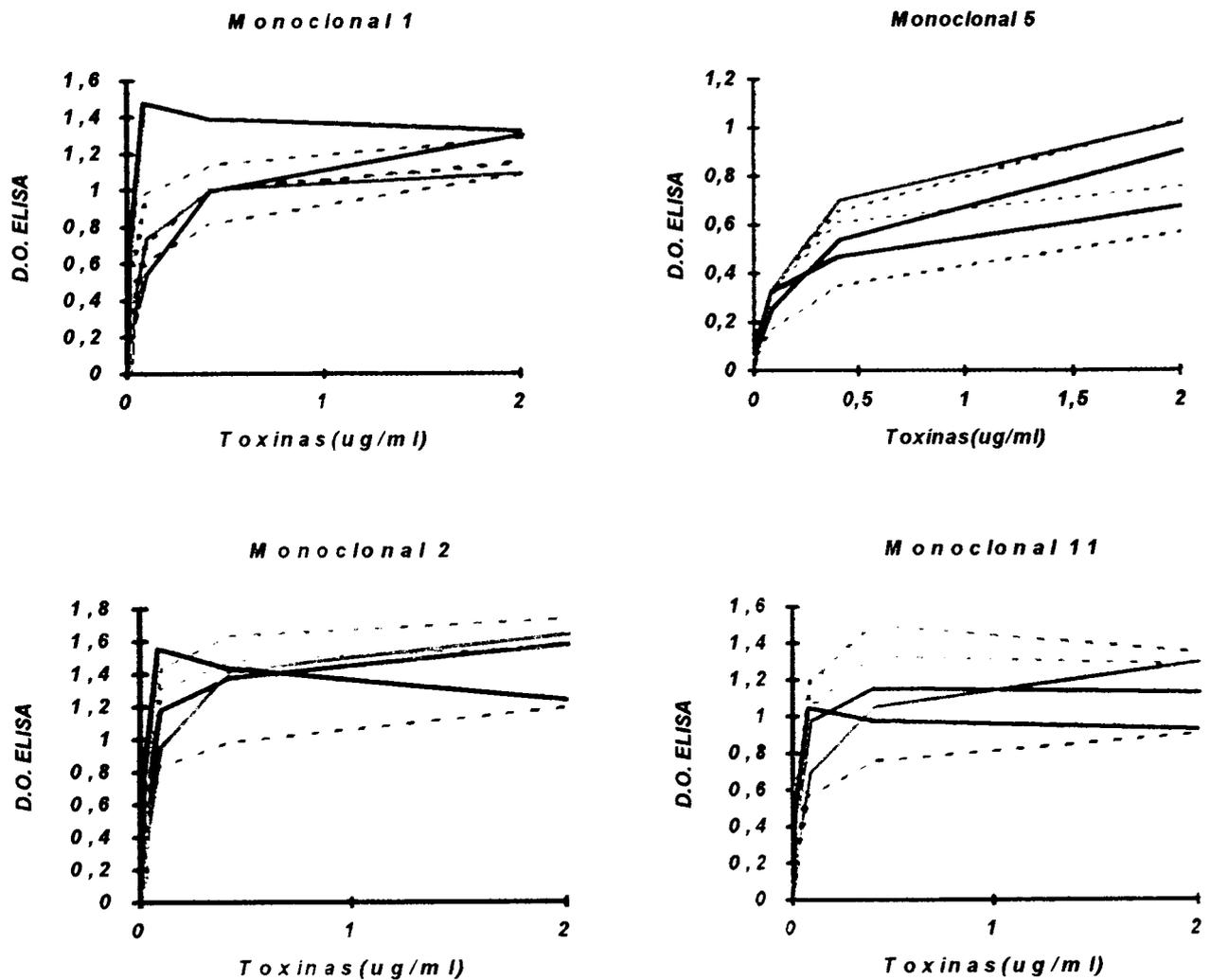


Figura 10 - Ensaio imunoenzimático utilizando, como ligante de fase sólida, anticorpos monoclonais contra epítopos conformacionais da molécula de fosfolipase, desafiados com concentrações variáveis de toxinas descritas a seguir, sendo utilizado como anticorpo primário revelador, anti-veneno crotálico produzido em coelho e revelado com anti IgG de coelho produzido em cabra conjugado a peroxidase. (—) Crotoxina nativa; (---) Crotoxina irradiada; (·-·) Subunidade básica nativa; (-·-·) Subunidade básica irradiada; (—) Crotoxina irradiada sem agregados; (—) Agregados.

a) Anticorpo monoclonal tipo 1: foi capaz de reconhecer todas as amostras, entretanto, apresentou maior afinidade pelos agregados.

b) Anticorpo monoclonal tipo 2: com exceção da CISA, que foi reconhecida com menor intensidade, todas as amostras foram reconhecidas igualmente por este anticorpo.

c) Anticorpo monoclonal tipo 5: este anticorpo reconheceu igualmente a subunidade básica não irradiada e crotoxina irradiada, reconheceu ainda a subunidade básica irradiada, crotoxina nativa, agregado e CISA, porém com menor afinidade, respeitando a ordem em que foram citadas.

d) Anticorpo monoclonal tipo 11: este anticorpo apresentou o mesmo grau de reação que o tipo 5.

Cabe ressaltar que os anticorpos monoclonais dos tipos **11** e **5** apresentaram valores de absorvância menores na reação, quando comparados com os do tipo **1** e **2**.

IV.10 - Mapa de Peptídeos

Os resultados oriundos da análise do mapa de peptídeos realizados para as subunidades, irradiadas ou não estão apresentados nas figuras (FIGs. 11 e 12). Comparando-se os gráficos, observa-se que não há diferença significativa entre os perfis obtidos.

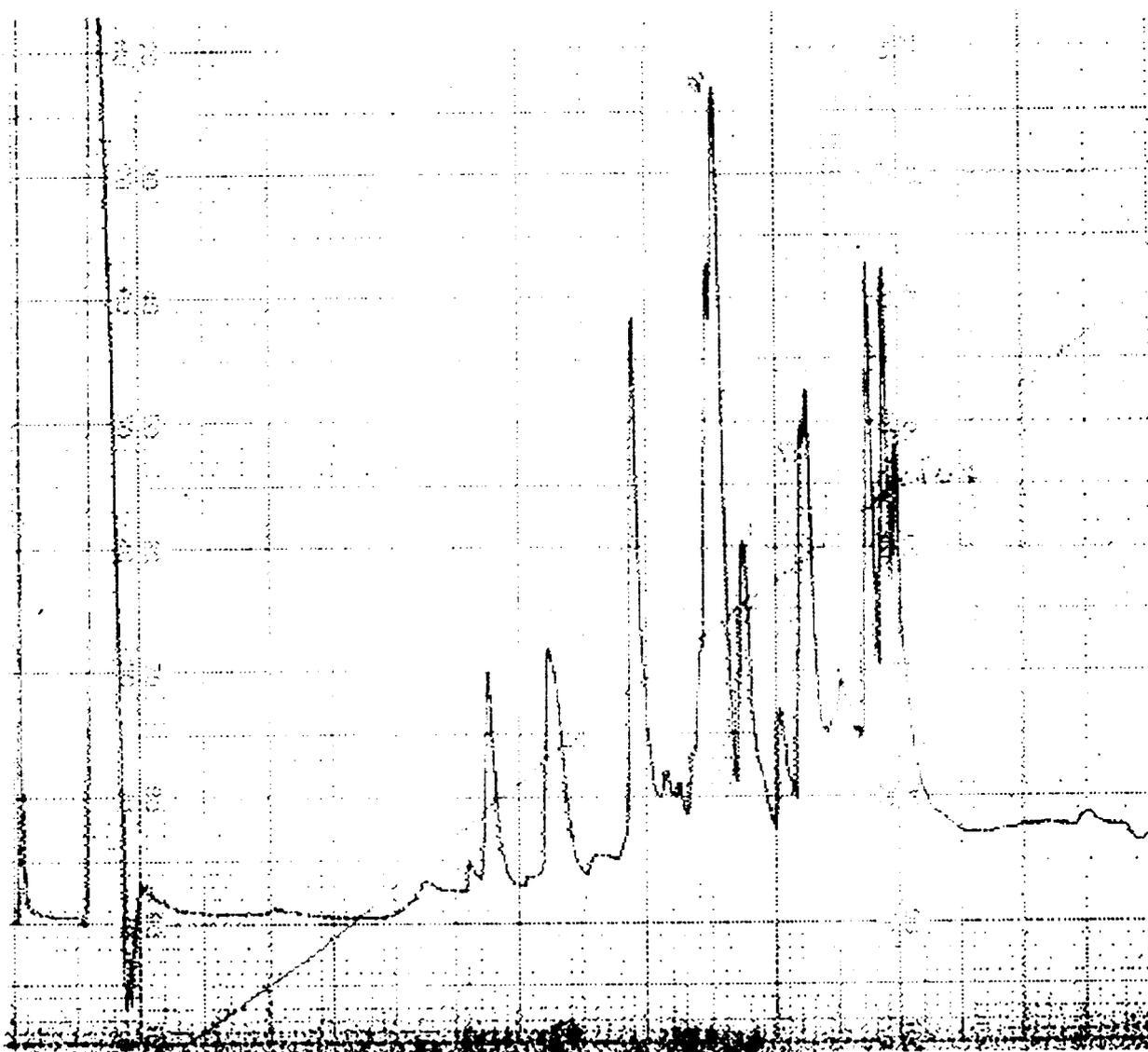


Figura 11 : mapa de peptídeos da fosfolipase não irradiada após alquilação e digestão

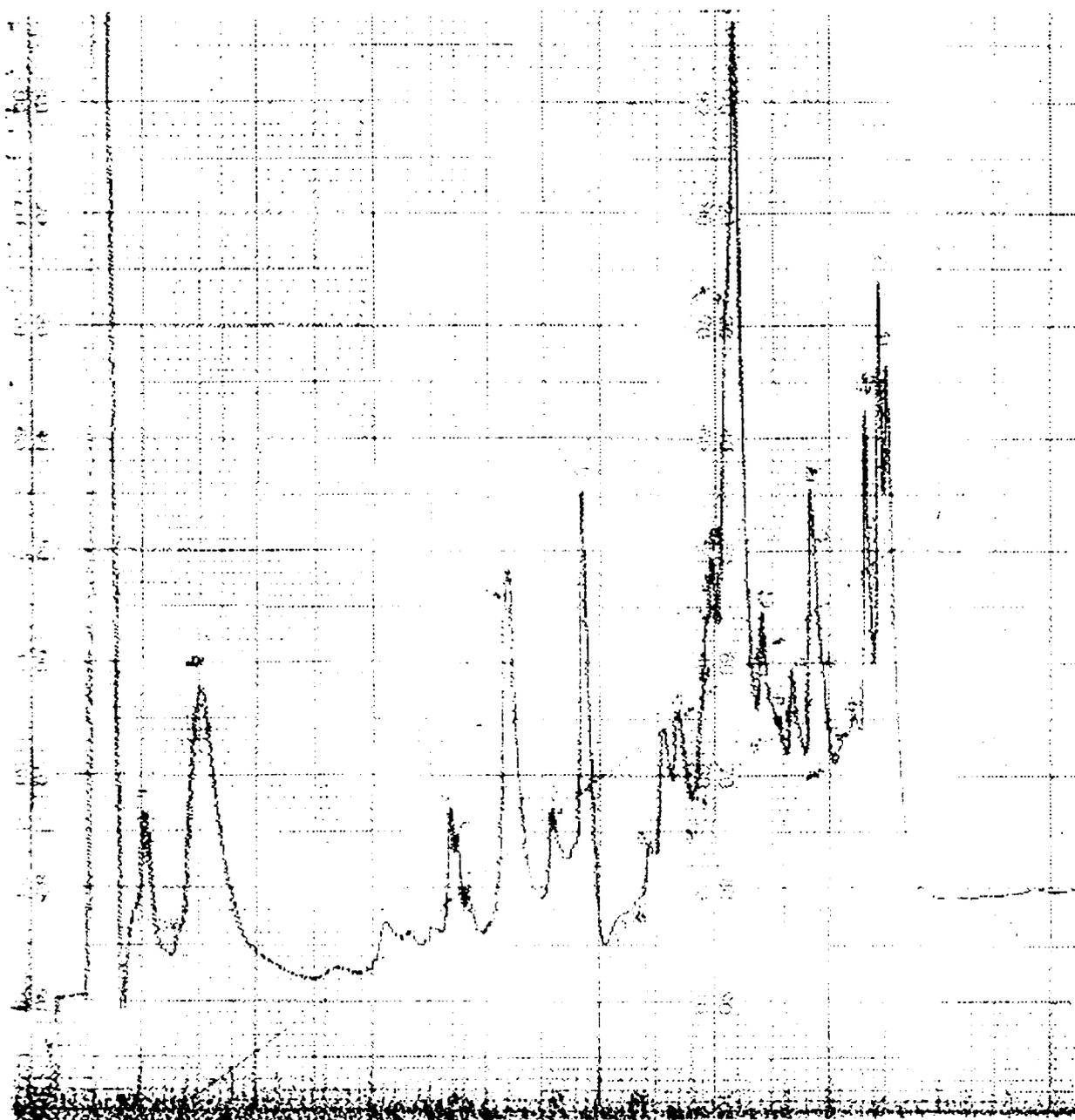


Figura 12: mapa de peptídeos da fosfolipase irradiada submetida aos processos de alquilação e digestão

IV.11 - Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos dos principais picos apresentados no mapa de peptídeos não mostrou diferença entre os resultados apresentados para as subunidades irradiadas e não irradiadas. A comparação foi feita baseada nos dados de AIRD et al. (1985, 1986).

V - DISCUSSÃO

SCHAEFFER et al. em 1988 mostraram que o veneno de *C. d. terrificus* é um mau imunógeno, resultando em uma baixa resposta dos cavalos, dados que foram confirmados por ANDERSON et al. em 1993. Assim, a irradiação da crotoxina com 2.000 Gy teve como objetivo destoxicá-la e mantê-la imunologicamente ativa conforme descrito por NASCIMENTO, 1991 e aprofundar os estudos no que diz respeito aos produtos formados após a irradiação da toxina.

A irradiação da crotoxina, resultou em uma agregação e geração de produtos, de menor peso molecular, resultantes de quebras. As técnicas cromatográficas e eletroforéticas ilustram bem a presença destes produtos, corroborando os dados de BARIDE et al., 1980; HAJOST & DELINCÉE, 1983 e NASCIMENTO, 1991.

Foram isoladas, por cromatografia de troca iônica, as subunidades tanto oriundas da crotoxina nativa quanto da irradiada. Esse experimento objetivou verificar se as mudanças nas propriedades da crotoxina irradiada eram devidas a uma das subunidades em particular.

Considerando-se que os resultado da metodologia utilizada para se isolar as subunidades, não foi suficiente para quebrar uma ligação covalente, já pudemos descartar a suspeita de que talvez o processo de irradiação estivesse promovendo uma ligação desse tipo entre as subunidades, justificando assim a sua baixa toxicidade. Isto porque segundo BON et al.(1979), a dissociação entre as subunidades é condição necessária para o desenvolvimento da toxicidade.

A atividade tóxica foi analisada para confirmar a destoxicação da crotoxina e testar as subunidades irradiadas ou não e os demais produtos oriundos da irradiação da toxina.

A crotoxina, após ser submetida aos efeitos da radiação, teve sua toxicidade diminuída de 50% enquanto que os agregados não mostraram qualquer toxicidade até os valores testados. Lembrando que a crotoxina irradiada sem agregados (CISA) apresentou valores de DL_{50} semelhantes aos obtidos para crotoxina não irradiada e que a quantidade de agregados formada durante a irradiação é aproximadamente 50% do total de proteínas, os agregados formados parecem ser os principais responsáveis pela redução da toxicidade da crotoxina, colocando de lado a hipótese de uma simples mudança na molécula da crotoxina, e indicando isto sim, que um novo complexo se forma.

A PLA_2 , que apresenta baixa toxicidade (RUBSAMEN et al., 1971), após ser submetida aos efeitos da radiação, se mostrou atóxica e assim, a crotapotina, sabidamente desprovida de toxicidade, não teve sua atividade tóxica testada depois de irradiada.

Os resultados obtidos através dos ensaios para medir a atividade fosfolipásica foram semelhantes aos apresentados para a atividade tóxica. A remoção dos agregados, desprovidos de atividade enzimática, da crotoxina irradiada, aumentou a atividade fosfolipásica da fração CISA. A irradiação da subunidade básica isoladamente reduz cerca de 90% da sua atividade enzimática. A crotapotina após a irradiação não inibiu a atividade enzimática da PLA_2 , nem tampouco aumentou sua atividade tóxica, que são propriedades típicas da crotapotina não irradiada (HENDON & FRAENKEL-CONRAT e BIEBER et al., 1990)

Os experimentos envolvendo a reassociação entre as subunidades, irradiadas ou não, sugerem que modificações que ocorrem na PLA₂ durante a irradiação sejam as responsáveis pela diminuição das atividades tóxica e enzimática, corroborando os dados de HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971, que mostram o vínculo entre estas atividades e a PLA₂.

Com o objetivo de detectar possíveis mudanças na composição dos resíduos de aminoácidos das subunidades após a irradiação, foi feito o mapa de peptídeos destas subunidades, seguida de uma análise de aminoácidos dos principais picos. Os mapas obtidos e a análise de aminoácidos, tanto para as subunidades nativas quanto irradiadas apresentaram o mesmo perfil descrito por AIRD et al., 1985, 1990. Não houve, nesta análise, quaisquer diferenças entre as subunidades nativas e irradiadas que pudessem ser atribuída aos efeitos da radiação. Assim as frações purificadas à partir da crotoxina irradiada não parecem sofrer mudanças na estrutura primária dos aminoácidos.

Considerando-se a alta miotoxicidade do veneno crotálico (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985) e a prevalência da crotoxina neste veneno, foram feitos ensaios para detecção da liberação de creatinaquinase no soro de camundongos que receberam as toxinas descritas em Métodos. O experimento foi acompanhado por 24 h., a diferentes intervalos de tempo pois segundo JORGE & RIBEIRO, 1990, a atividade sérica de Ck pode aumentar até cerca de 500 vezes o valor referência dentro das primeiras 24 h.

Os soros dos animais que foram inoculados com agregados apresentaram níveis de CK semelhantes aos daqueles que receberam apenas salina (grupo controle). Os soros dos animais que receberam crotoxina irradiada sem agregados (CISA) apresentaram, durante todo o acompanhamento, níveis de Ck sempre mais elevados

quando comparados aos apresentados pelas demais amostras inoculadas. Crotoxina e PLA₂ não irradiadas também induziram à liberação de altos níveis de CK, porém nunca maiores que os obtidos por injeção de CISA.

Certas enzimas que ocorrem em alta concentração no sarcoplasma do músculo podem ir para o sangue e servem de indicador de dano muscular. CK é a mais específica e sensível delas. Embora KOUYOUUMDJIAN et al., tenham relatado em 1986, que a crotoxina causa miotoxicidade através da atividade fosfolipásica, que é potencializada pela crotapotina, os dados ora apresentados não mostram diferença entre os valores de CK liberados pela crotoxina e PLA₂.

Através dos testes de ELISA pode ser visto que tanto os agregados quanto a CISA foram capazes de induzir formação de anticorpos, revelando um composto (agregado) atóxico, desprovido de atividade enzimática e miotóxica mas que no entanto era imunogênico. Foi mostrada ainda a habilidade do soro anti-agregado em neutralizar *in vivo* e *in vitro* a atividade tóxica.

Embora a CISA também tenha induzido formação de anticorpos até mais neutralizantes que aqueles induzidos pelos agregados, cabe lembrar aqui a sua alta toxicidade e injúria que provoca nos animais.

A utilização tanto dos monoclonais quanto das toxinas para a sensibilização das placas elimina possíveis dúvidas que pudessem surgir quanto à adsorção de algumas amostras, e que pudessem levar a falsos resultados caso apresentassem problemas de adsorção à placa (MIDDLEBROOK, 1991). Entretanto, os resultados obtidos em ambos os experimentos foram semelhantes

O reconhecimento dos agregados pelos anticorpos monoclonais nos mostra uma vez mais que apesar das diferenças nas propriedades que eles apresentam com

relação à crotoxina, estes agregados mantêm, íntegros, epitopos antigênicos importantes.

VI CONCLUSÕES

Como conclusões gerais, o presente trabalho mostrou que a crotoxina é destoxicada pela radiação através da formação de agregados de peso molecular elevado e variado, atóxicos, desprovidos de atividades enzimática e miotóxica, mas que mantêm suas propriedades antigênicas e imunogênicas, tornando-o um imunógeno ideal.

Como conclusões específicas, temos:

1- A irradiação da crotoxina pelos raios γ de ^{60}Co (2000Gy) resulta em agregação da molécula, além de gerar produtos de peso molecular baixo.

2- Os agregados são passíveis de purificação em colunas de exclusão molecular dos demais produtos gerados pela irradiação.

3- Estes agregados são pelo menos 40 x menos tóxicos para camundongos que a crotoxina nativa.

4- Os agregados não apresentam atividade fosfolipásica nem tampouco promovem liberação de creatinaquinase de tecido muscular de camundongos inoculados experimentalmente.

5- Os quatro anticorpos monoclonais utilizados apresentaram capacidade de reconhecimento de epitopos conformacionais na subunidade básica de crotoxina, tendo também reconhecido os agregados gerados pela radiação, comprovando a manutenção de epitopos conformacionais no processo.

6- A análise do mapa de peptídeos, seguido da análise de aminoácidos não mostrou diferenças significativas na estrutura primária, após a irradiação.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G., (1985), Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, **24**:7054.
- AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G., (1986), A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch.Biochem.Biophys.* **249**:296-300
- AIRD, S.D., YATES III, J.R., MARTINO, P.A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D.F. & KAISER, I.I., (1990) The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim.Biophys.Acta* **1040**:217-224.
- ALEXANDER, P., HAMILTON, L.D.G. and STACEY, K.A. (1960) - Irradiation of proteins in the solid state. I- Aggregation and disorganization of secondary structure in bovine serum albumin. *Radiation Research* **12**: 510.-525.
- ALEXANDER, P. and HAMILTON, L.D.G. (1961) - Irradiation of proteins in the solid state. II-Chemical changes produced in bovine serum albumin. *Radiation Research* **13**: 214-233.
- ALEXANDER P. and HAMILTON, L.D.G. (1962) - Irradiation of proteins in the solid state. III- Influence of oxygen and absorbed water on changes produced in bovine serum albumin. *Radiation Research* **15**:193-201.
- AMARAL, A., (1977), Serpentes do Brasil - Iconografia Colorida. São Paulo. Melhoramentos.
- AMARAL, C.F.S.; RESENDE, N.A.; PEDROSA, T.M.G.; DA SILVA, O.A.; PEDROSO, E.R.P., (1988), Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, **30**:288-292.
- AMORIM, M.F., MELLO, R.F. and SALIBA, F. (1951) - Envenenamento Botrópico e Crotálico. *Mem. Inst. Butantan* **23**:63-108

- ANDERSON, S.G., GUTIÉRREZ, J.M. and OWNBY, C.L. (1993) - Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. *Toxicon* **31**(8): 1051-1059.
- ANDRIANI, E.P (1995).- Irradiação da crotoxina em solução aquosa: Influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas. - Dissertação de Mestrado - IPEN/CNEN/SP
- ANTIMISIARIS, S.D., JAYASEKERA, P. and GREGORIADIS, G., (1993) - Liposomes as vaccine carriers. *Journal of Immunological Methods* **166**: 271-280.
- ARAÚJO, D.A.M., BEIRÃO, P.S.L. and GOMEZ, M.V. (1992) - The effect of crotoxin on the release of acetylcholine and lactate dehydrogenase from rat brain cortical slices. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* **25**: 707-711
- ARAÚJO, D.A.M. and BEIRÃO, P.S.L. (1993) - Effects of crotoxin on the action potential kinetics of frog skeletal muscle. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* **26**:1111-1121.
- AZEVEDO-MARQUES. M.M., CUPO, P. COIMBRA, T.M., HERING, S.E., ROSSI, M.A. and LAURE, C.J. (1985) - Myonecrosis, myoglobinúria and acute renal failure induced by South American Rattlesnake (*C.d. terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* **23**(4): 633-636.
- AZEVEDO-MARQUES. M.M.; HERING, H.E.; CUPO, P., (1987), Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South american rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, **25**(11):1163-1168.
- AZEVEDO-MARQUES. M.M., CUPO, P. e HERING, S.E. (1992) - Acidente Crotálico. *In: Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*: 161-167. - Samuel Schwartzman - 2ª ed. Sarvier - São Paulo - Brasil.
- BAILEY, A.J., RHODES.D.N. & CATER,C.W. (1964) Irradiation induced crosslinking in collagen. *Radiat.Res.* **22**:606-621
- BARIDE, R.M., JAIN. S.D., GAITONDE, B.B., (1980), Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J.Med.Res.*, **72**:571-576.

- BARRAVIERA, B. (1991) - Alterações hepáticas no acidente crotálico. *Rev. Soc. Med. Trop. - São Paulo* **24** (supl.II).
- BARRAVIERA, B.(1994) - Acidentes por serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*. *In: Venenos Animais: uma visão integrada*. 281-295. Barraviera, B. - EPUC - Rio de Janeiro.
- BARRIO, A. (1961 - Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamer.* **11**: 224.
- BICALHO, R.X.; ROCHA, O.A.; HENEINE, L.G.D.; MAGALHÃES, A.; HENEINE, I.F., (1990), The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **28**(2):171-179.
- BIEBER, A.L., MILLS Jr, J.P., ZIOLKOWSKI, C. and HARRIS, J.(1990) - Rattlesnake neurotoxins: Biochemical and Biological aspects. *J. Toxicol. - Toxins Review* **9**(2): 285-306.
- BON, C.; CHANGEUX, J.F.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H., (1979), Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur.J.Biochem.*, **99**:471-481.
- BON, C., CHOUMET, V., DÉLOT, E., FAURE, G., ROBBE-VINCENT, A. and SALIOU, B. (1994) - Double role of the non-toxic and non-enzymatic subunit of crotoxin in the toxin mechanism of action. *11th World Congress on Animal Plant and Microbial toxins*. Tel-Aviv, Israel - October 2-7.
- BOQUET, P. (1979) - Immunological properties of snake venoms. In: *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**:751-824, Lee, C. Y. (Ed), Springer-Verlag, Berlin.
- BOUCHIER, C. BOULAIN, J.C. BON, C. and MÉNEZ, A. (1991) - Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non-enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**:401-408.

- BOUSQUET, M.O., RADVANYI, F. and BON, C. (1991) - Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from snake venoms interacts with epithelial mammary cells, is internalized and induces secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* **82**: 41-50. .
- BRADFORD, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, **72**:248.
- BRAZIL, V. (1901) - Contribuição ao estudo do veneno ophídico. I- Espécies venenosas brasileiras; mortalidade por mordeduras de cobras. *Rev. Med. Trop. São Paulo* **4**: 255-60.
- BRAZIL, V. and RANGEL-PESTANA, B.(1909) Nova contribuição ao estudo do envenenamento ofídico. *Rev.Med.S.Paulo* **12**:415
- BRAZIL, V. and VELLARD, J. (1928) - Action coagulante et anticoagulante des venims. *Ann. Inst. Pasteur* **42**:403-451.
- BREITHAUPT, H., RUBSAMEN, K. and HABERMANN, E. (1974) - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Eur. J. Biochem.* **49**:333-345.
- BREITHAUPT, H. (1976) - Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* **14**: 221-233
- CALMETTE, A. (1907) - Les animaux nenimeux et la sérotherapie antivenimeuse. In: *Les Venins*. Masson et Cie. Paris.
- CAMPBELL, J.A. and LAMAR, W.W. (1990) - *The venomous reptiles of Latin America*. Ithaca, Cornell University Press.
- CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ROGERO, J.R., ANDRADE Jr, H.F., (1992), Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **25**:905.

- CARDOSO, J.L.C. and BRANDO, R.B. (1992) - Acidentes por animais peçonhentos. Clínica e tratamento. *Biblioteca Brasileira de Livro Médico Slide*. Livraria Editora Santos.
- CARROLL, S.B., THALLEY, B.S., THEKSTON, R.D.G. & LAING, G. (1992) Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon*, **30**:1017-1025
- CHANG, C.C. and LEE, J.D. (1977) - Short communications the presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin a comparison with β -bungarotoxin and crotoxin. *Toxicon* **15**: 571-576.
- CHANG, C.C. (1979) - The action of snakes venoms on nerve and muscle. In: *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**: 309-376, Lee, C.Y. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- CHANG and SU (1978) - The mechanism of potentiation of the pre-synaptic effect of phospholipase A₂ by the crotopotin component of the crotoxin complex. *Toxicon* **16**:402-405.
- CHANG, C.C., (1985), Neurotoxins and phospholipase activity in snake venoms. *Proc.Natl.Sci.Counc.B.ROC.*, **9**:126-142.
- CHAPMAN, J.D., REUVERS, A.P., BORSA, J. and GREENSTOCK, C.L. (1973) - Chemical radioprotection and radiosensibilization of mammalian cells growing *in vitro*. *Radiat. Res.* **56**:291-306.
- CHOUMET, V., JIANG, M.S., RADVANYI, F., OWNBY, C. & BON, C. (1989) Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of a phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, by non-precipitating antibodies (Fab). *FEBS Letters* **244**:167-173
- CHOUMET, V., SALIOU, B., FIDELER, L., CHEN, Y.C., GUBENSEK, F., BON, C. & DELOT, E. (1993) Snake venom phospholipase A₂ neurotoxins: potentiation of a

- single-chain neurotoxin by the chaperon subunit of a two component neurotoxin.
Eur.J.Biochem. **211**:57-62
- CLAUS, I and MEBS, D (1989) - Cross-neutralization of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. *Toxicon* **27**: 1397-1399.
- CONDREA, E., FLEATHER, J.E., RAPUANO, B.E., YANG, C.C. and ROSENBERG, P. (1981) - Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom.phospholipases A₂. *Toxicon* **19**: 705.
- COSTA, L.M., TAKEDA, A.K., BARBOSA, S.F.C., BERRA, J.A.P., ADELINO, M.G.F., SOERENSEN, B., PINTO, J.R., VANCETTO, M.D.C., (1985), Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus in natura*, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. *Vac.Soros*, **1**:24-29.
- COSTA, T.A. (1988), Efeitos da Radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, SP. (Dissertação de Mestrado - IPEN-USP)
- CHRISTENSEN, P.A. (1979) - Production and standardization of antivenin. In: *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**: 825-846. Lee, C.Y. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- CROSLAND, R.D.(1989) - Effect of chlorpromazine and quinacrine on the lethality in mice of the venoms and neurotoxins from several snakes. *Toxicon* **27**(6): 655-663
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E., (1988), Clinical and laboratory features of South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **82**:924-929.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E., (1990), Acute myocardial infarction-like enzyme profile in humans victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **84**:447-451.
- CURIN-SERBEC, V., DELOT, E., FAURE,G., SALIOU,B., GUBENSEK,F., BON,C. & CHOUMET.V. (1994) Antipeptide antibodies directed to the C-terminal part of

- ammodytoxin A react with the PLA₂ subunit of crotoxin and neutralize its pharmacological activity. *Toxicon*, **32**:1337-1348.
- DANIEL, J.P., HENEINE, L.D.G., TAVARES, C.A.P., NASCIMENTO, M.C.S. and HENEINE, I.F. (1987) - Generation of protective immune sera by *C.d. terrificus* venom detoxified by controlled iodination. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **20**: 713-720.
- DART, R.C., O'BRIEN, P.C. and McNALLY, J. (1990) - Neutralization of *Micrurus distans* venom by antivenin (*Micrurus fulvius*). *Toxicon* **28**: 606.
- DEGN, L.L., SEEBART, C.S. and KAISER, I.I. (1992) - Specific binding of crotoxin to brain synaptosomes and synaptosomal membranes. *Toxicon* **29**(8):973-988.
- DELÓT, E. & BON, C. (1993) Model of interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with pre-synaptic membranes. *Biochemistry* **32**:10708-10713
- DIZDAROGLU, M., GAJEWSKI, E. & SIMIC, M.G. (1984) Enzymatic digestibility of peptides cross-linked by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **45**:283-295
- DOLLY, J.O. (1992) - Peptide toxins that alter neurotransmitter release. *In Selective Neurotoxicity Hand. Exp. Pharm.* **102**: 682-717 - Springer-Verlag
- DOS SANTOS, M.C., DINIZ, C.R., PACHECO, M.A.W. and DIAS DA SILVA. (1988) Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* **26**:207-213
- FAURE, G. and BON, C. (1987) - Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* **25**:229-234.
- FAURE, G. and BON, C. (1988) - Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and their biological activities. *Biochemistry* **27**:730-738.
- FAURE, G., GUILLAUME, J.L., CAMOIN, L., SALIOU, B. and BON, C. (1991) - Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin

- from *Crotalus durissus terrificus* venom results from posttranslational modifications. *Biochemistry* **30**: 8074-8083.
- FAURE, G., HARVEY, A.L., THOMSON, E., SALIOU, B., RADVANYI, F. & BON, C. (1993) Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur.J.Biochem.* **214**:491-496
- FAURE, G., CHOUMET, V., BOUCHIER, C., CAMOIN, L., GUILLAUME, J.L., MONEGIER, B., VUILHORGNE, M. & BON, C. (1994) The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur.J.Biochem.* **223**:161-164
- FOHLMAN, J., EAKER, D., KARLSSON, E. and THESLEFF, S. (1976) - Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian Snake Taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *J. Biochem.* **68**: 457-469.
- FORTES-DIAS, C.L., LIN, Y., EWELL, J., DINIZ, C.R. and LIU, T.Y. (1994) - A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *The J. of Biol. Chem.* **269**: 15646-15651.
- FLOWERS, H.H. (1963) The effects of X-irradiation on the biological activity of cottonmouth moccasin (*Ancistrodon piscivorus*) venom. *Toxicon* **1**:131-136
- FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B., (1956), Fractionation and composition of crotoxin. *Archs.Biochem.*, **60**:64-73.
- FRAENKEL-CONRAT, H., JENG, T.W. and HSIANG, M. (1980) - *In: Natural Toxins* (Eaker, D. and Wadstrom, T. eds.) pp 561-567. Pergamon, Oxford.
- FREITAS, T.V., TAVARES, A.P., THEAKSTON, R.D.G., LAING, G. and NEW, R.R.C. (1989) - Use of liposomes for protective immunization against *Crotalus durissus* (Tropical rattlesnake) venom. *Toxicon* **27**: 341-347.
- FREITAS, T.V., FORTES-DIAS, C.L. and DINIZ, C.R. (1990) - Protection against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in animals immunized with crotoxin. *Toxicon* **28**:1491-1496.

- FREITAS, T.V., FORTES-DIAS, C.L., DINIZ, C.R., VELARDE, D.T. & FREITAS, C.R. (1991) Immunization of horses with *Crotalus durissus terrificus* (Southamerican rattlesnake) venom. A comparison of four different procedures. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **24**:281-289
- GIORGI, R. (1993) - Propriedade antinociceptiva do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* em camundongos. Dissertação de Mestrado - Fac. Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.
- GIORGI, R., BERNARDI, M.M. and CURY, Y. (1993) - Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* **31**: 1257-1265.
- GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. (1950), Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras -I- Análise eletroforética. *An.Acad.bras.Cienc.*, **22**:141-149.
- GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J., THEAKSTON, R.D.G. and REID, H.A. (1981) - Specificity of antibodies raised to the crotoxin complex from the venom of *Crotalus durissus terrificus* using the methods of double immunodiffusion and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Toxicon* **17** (suppl. 1): 57.
- GRALÉN, N. & SVEDBERG, T., (1938) - The molecular weight of crotoxin. *Biochem.J.*, **32**:1375
- GREENSTOCK, C.L. (1981) - Redox process in radiation biology and cancer. *Radiat. Res.* **86**: 196-211.
- GREENSTOCK, C.L. (1984a) - Oxy-radicals and the radiobiological oxygen effect. *Isr. J. Chem.* **24**: 1-10.
- GRILLO-RODRIGUES, O. & SCANNANE, H.R., (1976), Detoxification of fraction of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*, **14**:400-401.
- GUARNIERI, M.C. (1992) Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*. Tese de Doutorado - IPEN/CNEN/SP.

- GUIDOLIN, R., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G., CARICATI, C.P., LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F., PINTO, J.R., MARCELINO, J.R., (1989), Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálicos tratados com glutaraldeído. *Mem.Inst.Butantan*, **51**:85-90.
- GUTIÉRREZ, J.M., DOS SANTOS, M.C., FURTADO, M.F. and ROJAS, G. (1991) - Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon* **29**: 1273-1277.
- HABERMANN, E. & BREITHALPT, H., (1978), The crotoxin-complex - An example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*, **16**:19-30.
- HAJOST, G.Y. and DELINCÉE, H., (1983) Structural investigation of radiation induced aggregates of ribonuclease. *Int.J.Radiat.Biol.* **44**: 333-342
- HANASHIRO, M.A., DA SILVA, M.H. and BIER, O.G. (1978) - Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus* phospholipase A₂. *Immunochemistry* **15**: 745-750.
- HARVEY, A.L., ANDERSON, A.J., MARSHAL, D.L., PEMBERTON, K.E. and ROWAN, E.G. (1990) - Facilitatory neurotoxins and transmitter release. *J. Toxicol. Toxins Reviews* **9**: 225-242.
- HATI, A.K., HATI, R.N., MANDAL, M., PANDA, D. and DAS, S. (1989) - The effect of gamma irradiated detoxified viper venom as a toxoid against viper venom. *The Snake* **21**: 36-40.
- HATI, R.N., MANDAL, M. and HATI, A.K. (1990) - Active immunization of rabbit with gamma irradiated russell's viper venom toxoid. *Toxicon* **28**(8): 895-902.
- HAWGOOD, B.J., SMITH, I.C.H., STRONG, P.N., (1988), Early induction by crotoxin of biphasic frequency changes and giant miniature endplate potentials in frog muscle. *Br.j.Pharmacol.* **94**:765-772.

- HAWGOOD, B.J. and BON. C. (1991) - Snake venom presynaptic toxins. *In: Handbook of Natural Toxins - Reptile Venoms and Toxins* (Tu,A.T., ed.) Marcel Dekker, N.Y. 5(3).
- HENDON, R.A. and FRAENKEL CONRAT, H. (1971) Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **68**: 1560-1563
- HENEINE, L.D.G., CARDOSO, V.N., DANIEL, J.P. and HENEINE, I.F. (1986) - Detoxification of the T₂ fraction from a scorpion (*Tytilus serrulatus*) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivates. *Toxicon* **24**: 501-505.
- HENEINE, I.F., HENEINE, L.D.G., DANIEL, J.P., NASCIMENTO, M.C.S. and ROCHA, O.A. (1988) - Properties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination. *Anais da Acad. Ciências do Estado de São Paulo* **57**(II):55-66.
- HENEINE,I.F., LAHMANN W.M. & ROCHA, O.A. (1992) A toxoid prepared for cholera toxin by iodination. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* **25**:913-917
- HIGASHI, H.G., GUIDOLIN. R., NISHIKAWA, A.K., YAMAGUSHI, I.K., STEPHANO, M.A., DOS SANTOS, M.C. and DIAS DA SILVA, W. (1989^A) - Produção de anticorpos anti-veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por PLA₂. *Mem. Inst. Butantan - São Paulo* **51**: 91-100.
- HORST, J., HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1972) - The active components of crotoxin. *Biochem. and Biophys. Res.* **46**(3).
- HORTNAGL, H. and HANIN, I. (1992) Toxins affecting the cholinergic system. in *Selective Neurotoxicity Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag. p102.
- HSEU, M.J., GUILLORY, R.J. and TZENG, M.C. (1990) - Identification of a crotoxin-binding protein in membranes from guinea pig brain by photoaffinity labeling. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*, **22**:1.
- HUANG, S.Y. and PEREZ, J.C. (1980) Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, **18**: 421-426

- JENG, T.W., HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1978) - Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 600-604.
- JOHNSON, E.K., KARDONG, K.V. and OWNBY, C.L. (1987) Observation on white and yellow venom from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) *Toxicon* **25**: 1168-1180
- JORGE, M.T. and RIBEIRO, L.A. (1988) - Incoagulabilidade sanguínea no acidente crotálico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **21**(supl.):121.
- JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A., (1990), Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Ass. Med. Bras.*, **36**(2):66-77.
- JORGE, M.T., and RIBEIRO, L.A. (1989) - Acidentes por Animais Peçonhentos. *In: Doenças Transmissíveis* pp 133-141. Amato Neto, V. and Baldy, J.L.S. (eds.) 3ª ed. São Paulo - Sarvier.
- JORGE, M.T., and RIBEIRO, L.A. (1992) Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sulamericana (*Crotalus durissus*) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **34**:347-354
- KANKONKAR, S.R., KANKONKAR, R.C., GAITONDE, B.B. and GROSH, S.V. (1975) - Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical applications. *In: Radiosterilization of Medical Products*. IAEA.
- KAISER, I.I., MIDDLEBROOK, M.H., CRUMRINE, M.H. and STEVENSON, W.W. (1986) Cross reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon* **24**: 669-678.
- KEMPNER, E.S. (1987) Molecular size determination of enzymes by radiation inactivation. *J. Mol. Biol.* **35**:107-147
- KINI, M.R. & EVANS, H.J. (1989) - A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon*, **27**(6):613.
- KONDO, H., KONDO, S., SADASHIRO, S., YAMAGUCHI, K., OSAKA, A. and HINATA, R. (1971) - Standardization of antivenine. II- A method for determination of

- antihemorrhagic potency of Habu antivenine in the of two hemorrhagic principles and their antibodies. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **18**:127-141.
- KOUYOUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A., (1986), Muscle necrosis caused by sub-units of crotoxin. *Toxicon*, **24**(6):575-583.
- LAING, G. and THEAKSTON, R.D.G. (1993) - Immunization against *Echis ocellatus* (Carpet Viper) venom using liposomes incorporating immunostimulants: role of lipopolysaccharide in conferring protection in a mouse model. *Toxicon* **31**(5): 615-626.
- LI, C.H. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1942) Electrophoresis of crotoxin *J. Amer. Chem. Soc.* **64**:1586.
- LI, Q. and OWNBY, C.L. (1992) - Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon* **30**(11): 1319-1330.
- LI, Y.L., CHENG, H.J., WU, M.Q. and ZHANG, Y.Y. (1990a) - Preparation of the toxoid of the pallas venom. *J. Toxicol. Toxin Reviews* **9**:132.
- LI, Y.L., CHENG, H.J., ZHANG, Y.Y. and WU, M.Q. (1990b) - Toxicidade and immunogenicity of the adsorbed pit viper's venom. *J. Toxicol. Toxin Reviews* **9**:132.
- LI, Y., FORAN, P., FAIRWEATHER, N.F., PAIVA, A., WELLER, U., DOUGAN, G. and DOLLY, J.O. (1994) - A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes its proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain. *Biochemistry* **33**: 7014-7020.
- LLORET, S. and MORENO, J.J. (1993) - Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* **31**(8): 949-956.
- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J.M. (1990) - Dissociation of enzymatic and toxic activities by the use of antibodies. *Toxicon* **28**(11): 1245-1246.

- MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S., (1986). Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo.* **28**:228-233.
- MANDAL, M., HATI, R.N., BARDHAN,D.K. and HATI,A.K. (1991) Effect of gamma radiation on Cobre(*Naja naja*) venom as a toxoid. *The Snake* **23**:44-48
- MANDAL, M., HATI, R.N and HATI,A.K. (1993) Neutralization of pathophysiological manifestations of Russel's viper envenoming by antivenom raised against gamma-irradiated toxoid. *Toxicon* **31**:213-216
- MARLAS, G. and BON, C. (1982) - Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. *Eur. J. Biochem.* **125**:157-165.
- MIDDLEBROOK, J.L. (1991) Cross-neutralization of phospholipase A₂ neurotoxin from snake venoms. *Toxicon* **29**:1481-1488.
- MURATA, Y. (1988)Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Dissertação de Mestrado - IPEN/CNEN/SP.
- NAHAS, L., DENSON, K.W.E. and MAC FARLANE, R.G. (1964) - A study of the coagulant action of eight snake venoms. *Trombos. Diathes. Haemorrh.* **12**: 355-367.
- NAKAZONE,A.K., OKAZAKI. K. and GONÇALVES, J.M. (1983) - Comportamento de linfócitos de camundongos *in vitro* devido a crotoxina e suas subunidades (fosfolipase e crotapotina). *Arq. Biol. Technol.* **26**(2):res.MI-M36
- NAKAZONE, A.K., ROGERO, J.R., GONÇALVES, J.J., (1984), Crotoxin - I - Immunology and interaction of the subunits. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **17**:119.
- NASCIMENTO, N., (1991), Estudo comparativo entre crotoxina nativa e crotoxina irradiada - Aspectos bioquímicos e farmacológicos- Dissertação de Mestrado - IPEN/CNEN-SP.
- OKONOJI, T., HATTORI. Z., OGIJO, A., MITSUI, S., (1979), Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527.

- OUYANG, C. TENG, C.M. and HUANG, T.F. (1992) - Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* **30**(9): 945-966.
- PHISALIX, C. and BERTRAND, G. (1894) - Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **118**: 356-358.
- POSSANI, L.D., CASTRO, J.F. and JULIA, J.Z (1981) - Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) venom. *Toxicon* **19**(2): 323-329.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O.,(1981), Convulxin, a new toxin from the South american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, **19**(6):875-887.
- PURANANANDA, C., (1972), Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization. Viena, Int.Atomic Energy Agency.
- RADVANYI,F., KEIL,A., SALIOU,B., LEMBEZAT, M.P. & BON, C. (1989) Binding of divalent and trivalent cations with crotoxin and with its phospholipase and its non-catalytic subunits: effects on enzymatic activity and on its interaction of phospholipase component with phospholipids. *Biochim.Biophys.Acta.* **1006**:182-193.
- RAW. I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES. M.I.; KAMIGUTI, A.S., (1986), Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **19**.333-338.
- RELYVELD, E.H., GIRARD, O., CHEYROUX, M., ASSO, J. and De RUDDER, J. (1974)- Nouveau procédé d'inactivation pour la preparation de vaccins. *In: Developments in Biological Standardizations* **27**:236-348. S. Karger, Basel.
- REID. H.A. and THEAKSTON, R.D.G. (1983) The management of snake bite. *Bull. WHO* **61**:885-895
- RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLENAVE, R.N.U.R., (1989), Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde, p.37.

- RIBEIRO, L.A., (1990), Epidemiology of ophidic accidents. *Mem.Inst.Butantan*, **52**(suppl.):15-16.
- RIBEIRO, L.A.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F., ALBUQUERQUE, M.J. and TAKAOKA, N.Y. (1990) - Epidemiological and clinical aspects of accidents due to poisonous snakes in the State of São Paulo, Brazil, from 1986 to 1988. *Toxicon* **62**: 1.
- RIBEIRO, L.A. (1991) Estudo epidemiológico de acidentes por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, atendidos no Hospital Vital Brazil. Dissertação de Mestrado - Fac. Saúde Pública -USP.
- RIBEIRO, L.A., PIRES DE CAMPOS, M.J. ALBUQUERQUE and TAKAOKA, N.Y. (1993) - Acidente ofídico no Estado de São Paulo. *Rev. Ass. Med. Bras.* **39**(1): 4-7.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., HAWGOOD, B.J., SMITH, I.C.H., (1990), Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon*, **28**(12):1479-1489.
- ROGERO, J.R., (1978), Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* - Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica Hidrogênio-Trício. Tese Doutorado. Instituto de Química. USP.
- ROSENBERG, G. (1986) - The relationship between enzymatic and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. *In: Natural Toxins*, pp 129-179 (Harris J.B. ed.)
- ROSENFELD, G., HAMPE, O.G. and KELEN, E.M.A. (1959) - Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms, determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan* **29**: 143-163.
- ROSENFELD, G. (1965) - Moléstias por venenos animais. *Pinheir. ter.* **17**: 3-15.
- ROSENFELD, G. (1971) Ação neurotóxica de venenos ofídicos (*Crotalus* e *Micrurus*) no sistema nervoso central. Interpretação clínica. *Ciência e Cultura.* **23**:(supl.) 45
- ROSENFELD, G. (1971) - Symptomatology, Pathology, and treatment of snake bites in South America. in *Venomous animals and their venoms*, vol 2. chapter 34.

- ROSENFELD, G. (1976) - Acidentes por Animais Peçonhentos (serpentes , aranhas e escorpiões). *In: Doenças Infecciosas e Parasitárias* pp 970-983 (Veronesi, R.), 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ROSENFELD, G. (1991). - Acidentes por Animais Peçonhentos *In: Doenças Infecciosas e Parasitárias* pp 951-962 (Veronesi, R.), 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- RUBSAMEN, K., BREITHALPT, H., HABERMANN, E., (1971), Biochemistry and Pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **270**:274-288.
- SADASHIRO, S., KONDO, S., KONDO, H., OHSAKA, A., FUKUSHIMA, H. and MURATA, R. (1978) - Standardization of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) snake venom toxicity. *Toxicon* **16**: 275-282.
- SALAFRANCA, E.S., (1973), Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*). *Int.J.Appl.Radiat.Isot.*, **24**:60.
- SCHAEFFER Jr., R.C., RANDALL, H., RESK, J. and CARLSON, R.W. (1988) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of size selected crotalid venoms antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. *Toxicon* **26**:67-76
- SHINA, R., YATES, S.L., GHASSEMI, A., ROSENBERG, P. & CONDREA E. (1990) Inhibitory effect of EDTA-Ca²⁺ on the hidrolisis of synaptosomal phospholipids by phospholipase A² toxins and enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 2233-2239
- SHORT, H.E. & MALLICK. S.M.K., (1935), Detoxification of snake venoms by the photodynamic action of methylene blue. *Indian J.Med.Res.*, **22**:529-536.
- SIMPSON, L.L., LAUTENSLAGER,G.T., KAISER, I.I. and MIDDLEBROOK, J.L. (1993) Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localize to produce their neuromuscular blocking effects. *Toxicon* **31**:13-26.
- SJOSTROM, L., AL-ABDULLA, I.H., RAWAT, S., SMITH, D.C. and LANDON, J.(1994) A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon* **32**:427-433

- VITAL-BRAZIL, O., (1972), Neurotoxins from the South american rattlesnake. *J. Formosan Med. Assoc.*, **71**:394-400.
- VITAL-BRAZIL, O. (1990) - Sinais e sintomas neurotóxicos do envenenamento ofídico: ação central ou periférica da peçonha das serpentes? *Rev. Ass. Med. Brasil* **36** (2): 63-65.
- WARRELL, D.A. (1986) - Tropical snake bite: Clinical studies in south-east Asia, In: *Natural Toxins* pp 25-45, Harris, J.B., (Ed) Clarendon Press, Oxford.
- WHO, (1981), Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO,
- YANG, C.C.(1994) Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, **13**:125-177.
- YEN, C.H. and TZENG, M.C. (1991) - Identification of a new binding protein for crotoxin and other neurotoxic phospholipase A₂ on brain synaptic membranes. *Biochemistry* **30**: 11473-11477.