

ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DE VENENOS OFÍDICOS POR MEIO DA RADIAÇÃO IONIZANTE

José Roberto Rogero, bioquímico, obteve seu grau de doutor em Conformação de Proteínas pela Universidade de São Paulo e fez seu pós-doutorado na Universidade da Pensilvânia - USA. Atualmente é pesquisador da Supervisão de Radiobiologia e assessor de Relações Institucionais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares -IPEN/CNEN/SP.

Nanci do Nascimento, biomédica, obteve seu grau de doutor em Tecnologia Nuclear pelo IPEN/CNEN/SP e fez seu pós-doutorado na Universidade de Wyoming - USA. Atualmente é assistente de Pesquisa na Supervisão de Radiobiologia do IPEN.

Serpente *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel brasileira, conhecida por promover acidentes de alta letalidade.

As serpentes surgiram pela primeira vez durante o Cretáceo inferior, cerca de 100 a 130 milhões de anos atrás, e pertencem à classe Reptilia (répteis), subclasse Lepdosauria, ordem Squamata, subordem Serpentes, grupo Vertebrata (vertebrados).

Os ancestrais das serpentes são os lagartos, dos quais elas foram perdendo os membros ao longo do percurso da evolução biológica.

As serpentes compreendem cerca de 3.200 espécies, das quais quase 50% são venenosas. A distribuição das serpentes venenosas é vasta; estão ausentes na Antártida, Chile, algumas ilhas do Caribe, Madagascar, Nova Zelândia e algumas ilhas do Pacífico e do Brasil (Trindade, Fernando de Noronha) (Bruno Soerensen).

Os venenos das serpentes são usados tanto para o ataque como para a defesa. Assim, eles contêm componentes que servem para imobilizar a presa, mas que também facilitam a digestão. Mais de 90% do peso seco do veneno são polipeptídeos, os quais incluem enzimas, toxinas e pequenos peptídeos (W.C.Bowman - Snake Toxins).

Devido a esta alta complexidade dos venenos, os acidentes por animais peçonhentos constituem problema de saúde pública (Soerensen), nos países em desenvolvimento, dadas a incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nos acidentados.

No Brasil, das 69 espécies venenosas existentes, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, representado pelas jararacas, 6 ao gênero *Crotalus* (cascavéis), 2 ao gênero *Lachesis* (surucucus) e 29 ao gênero *Micrurus* (corais), sendo que a maior incidência de acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops* (87,5%), seguida pelos gêneros *Crotalus* (8,5%), *Lachesis* (3,2%) e *Micrurus* (0,8%), (Jorge & Ribeiro, 1990), resultando em um alto índice de acidentes ofídicos, que ocorre principalmente na área rural e na periferia dos grandes centros (20.000 casos/ano).

O único tratamento de eficácia comprovada nos casos de acidentes envolvendo serpentes é a soroterapia (Barraviera, 1994), que consiste na administração, em tempo hábil, de anti-soros utilizando-se via e doses adequadas. (Cupo et al., 1991).

Os anti-soros consistem de uma solução rica em anticorpos antiveneno, concentrada e ampolada, obtida a partir do

plasma tratado com pepsina, seguido de purificação por precipitação com sulfato de amônio (Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993). Estes anticorpos são obtidos a partir de inóculo, em cavalos, de amostras contra as quais se deseja uma resposta imune.

Por ocasião do acidente, o tratamento consiste na administração do anti-soro antiveneno monoespecífico, por via endovenosa, o que garante maior rapidez e eficiência na neutralização das toxinas circulantes (Cupo et al., 1991; Ribeiro et al., 1993). O número de ampolas a ser administrado, em geral, é calculado de acordo com o quadro clínico desenvolvido, ou seja, de 10 a 20 ampolas para os casos leves e moderados e acima de 20 para os casos severos. Porém, quando a soroterapia é tardia ou a quantidade de anti-soro não é suficiente para neutralizar todo o veneno circulante, as lesões e danos podem se tornar irreversíveis, podendo resultar em óbito (Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993).

Os soros antiofídicos são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se o veneno bruto como imunógeno. O cavalo, pelo seu grande porte, permite a coleta de grandes volumes de plasma, ricos em anticorpos antiveneno (Schvartsman, 1992). Contudo, estes animais apresentam decaimento de sua resistência orgânica que pode resultar em óbito (10% dos animais utilizados na produção de soro morrem durante o processo de imunização) devido à alta toxicidade do veneno e também pela utilização de adjuvantes (Ribeiro et al., 1993).

Considerando-se que o rebanho equino destinado para esta finalidade é escasso, e que a sua manutenção é onerosa, qualquer perda é econômica e clinicamente significativa. Uma outra alternativa que se tem estudado é o emprego de ovinos na produção de soros, que têm apresentado uma melhor resposta imunológica quando comparados com os equinos (Sjostrom et al., 1994).

Deve-se ressaltar também que, no caso da imunização com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, ocorre lesão no local do inóculo, debilitando o animal. Tal efeito, entretanto, não é observado quando o animal é imunizado com o veneno submetido à radiação gama.

Fonte de Cobalto-60, Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd.), onde é

Agradecimento: Ao dr. Ivan Kaiser pela foto da serpente *C.d.terrificus* (cascavel brasileira).

feita a irradiação do veneno.

Assim, estamos testando um novo esquema de imunização, em carneiros, e que envolve toxinas irradiadas. Com isto, poderemos diminuir o sofrimento do animal, obter uma melhor resposta e ainda continuar utilizando os carneiros imunizados para a extração da lã, uma vez que o veneno irradiado não promove qualquer dano tecidual no local do inóculo.

Nossos estudos tiveram início na década de 80, quando a produção de anti-soros, no Brasil, sofreu uma queda considerável. Este declínio foi resultado da suspensão da produção de imunobiológicos por laboratórios da rede privada em 1984. Desde então, o Estado de São Paulo comprou toda a produção nacional e responsabilizou-se pela distribuição às secretarias estaduais. As secretarias, por sua vez, passaram a ser responsáveis pela distribuição em seu município e notificação dos acidentes ao Ministério da Saúde, e os pacientes passaram a receber o tratamento gratuitamente, quando atendidos nos centros de atendimento credenciados (Ribeiro et al., 1993).

Contudo, a escassez de anti-soros para uso veterinário continua sendo um grave problema. Os animais de raça, gado leiteiro, de corte etc. ficam à mercê dos acidentes, uma vez que, no Brasil, a produção de antivenenos ofídicos que é realizada pelo Instituto Butantan (SP), Fundação Ezequiel Dias (MG) e Instituto Vital Brazil (RJ), sendo distribuído para todo o país pelo Ministério da Saúde, destina-se exclusivamente ao uso humano.

Com isto, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas que melhorassem a produção de anti-soros, no sentido de diminuir o sofrimento do animal soroprodutor, assim como maneiras de se aumentar a produção destes anti-soros para que seu uso pudesse ser estendido a todos aqueles sujeitos às picadas de serpentes, inclusive os animais domésticos.

Vários trabalhos têm sido realizados com toxinas com o intuito de se obter um produto menos tóxico, mas que preserve, no entanto, suas propriedades imunogênicas e antigênicas originais, e, neste sentido, a radiação ionizante vem sendo empregada com muito sucesso.

RADIAÇÃO GAMA

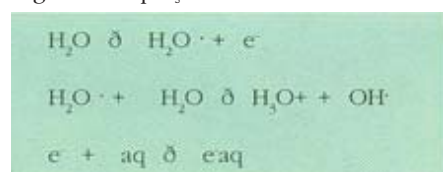
A passagem de uma radiação eletromagnética ou mesmo um fóton causa projeção de um elétron de um átomo, resultando na criação de um par de íons, positivo e negativo. Esse fenômeno, chamado ionização, é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para tecidos biológicos, sem, no entanto, produzir radioatividade. Sabe-se que a energia absorvida a partir da radiação ionizante (raios gama) pode

inativar material biológico por dois caminhos: direta ou indiretamente.

O efeito direto ocorre quando o evento primário, isto é, a ionização, é produzido na própria molécula e tem maior probabilidade de ocorrer quando a substância é irradiada no estado seco. No efeito indireto, observa-se a reação entre as moléculas estudadas e os produtos de interação da radiação com a água e outros solventes. Desta maneira, quando um composto é irradiado em solução, o efeito indireto se associa ao direto. Exemplificando, enzimas puras em soluções muito diluídas são inativadas por uma menor exposição aos raios gama do que a necessária para inativar preparações secas ou contendo outros constituintes.

Assim, a irradiação de proteínas em solução aquosa tem sido utilizada, com muita frequência, por proporcionar os mesmos efeitos da irradiação a seco, com o uso de doses menores de radiação. Nestas condições, o efeito indireto é predominante, tornando as espécies reativas da água particularmente importantes.

A irradiação da água pura ou de soluções muito diluídas gera espécies moleculares e radicais livres conforme as seguintes equações:



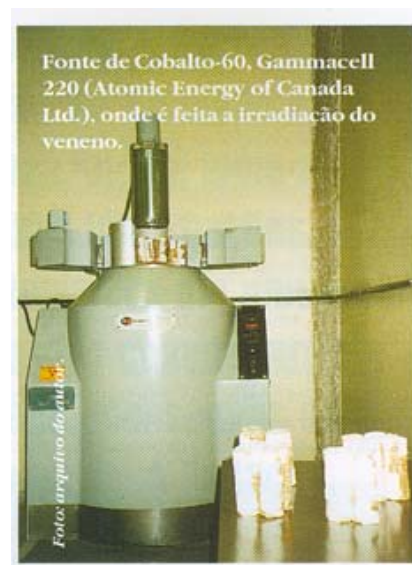
A reatividade das espécies radical hidroxila (OH \cdot) e elétron aquoso (e-aq) formadas é tão grande que, entre 10 \cdot 14 e 10 \cdot 12 segundos, poderão colidir, formando espécies reativas secundárias.

O radical hidroxila é destacado como importante promotor dos danos às macromoléculas. Este reage com proteínas, principalmente pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa e de grupos sulfidrilas, além de reagir com anéis aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos.

Os elétrons hidratados reagem com os hidrogênios dos aminoácidos aromáticos da mesma maneira que os radicais hidroxila, além de promover a desaminação de aminoácidos como alanina, arginina, glicina, histidina, cisteína, cistina e aromáticos.

As lesões primárias, produzidas pela absorção de energia da radiação, embora distribuídas ao acaso através de toda a molécula protéica, podem estabilizar-se em sítios favoráveis por transferência de energia intramolecular e rearranjo.

As reações iniciadas pelas espécies reativas (OH \cdot e e-aq) podem induzir mudanças na estrutura primária pela destruição de aminoácidos específicos e quebra de cadeias polipeptídicas; estruturas se-



cundária e terciária, pela desestabilização de pontes de hidrogênio e sulfidrilas, agregação e desdobramento da molécula; e quaternária, pela dissociação de subunidades. Estas mudanças estruturais podem levar a modificações nas propriedades tóxicas, enzimáticas e imunológicas com consequente perda de atividade biológica das proteínas (Butler et al., 1987).

Os radicais livres, dentre os produtos oriundos do processo de absorção de energia, têm importância particular. Um radical livre é um átomo ou uma molécula com um único elétron do orbital desemparelhado, tem vida curta e alta probabilidade de reagir com outro átomo, quer combinando seu elétron desemparelhado com um elétron de outro átomo, quer pela liberação de um elétron desemparelhado a outro átomo.

Cada uma destas interações podem gerar íons adicionais ou radicais livres, e a maioria dos danos da radiação às moléculas orgânicas está associada com tais cadeias de interações de radicais livres secundários (Butler et al., 1987) Estes radicais livres, extremamente danosos às macromoléculas, podem entretanto ser capturados por substâncias denominadas scavengers, que conseguem seqüestrá-los do meio onde se encontram, protegendo assim as macromoléculas.

Dentre as espécies reativas produzidas durante a irradiação, o radical hidroxila e o elétron hidratado têm maior importância por possuírem alto rendimento quando se utiliza a radiação gama de ^{60}Co .

O efeito final da irradiação de proteínas é diferente quantitativa e qualitativamente, de acordo com as condições de irradiação empregadas. Assim, ao se submeter uma amostra aos efeitos da radiação gama, alguns parâmetros devem ser analisados:

condições físicas: fonte, dose, taxa de dose, temperatura, amostras líquidas ou cristalizadas. condições químicas: tipo de solvente, concentração da amostra,

presença de gases e presença de radiomodificadores. características biológicas: toxicidade, antigenicidade e conteúdo enzimático.

Alexander & Hamilton, 1960, mostram que a irradiação de proteínas promove danos na cadeia lateral dos aminoácidos, aparecimento de novos grupos, quebras de ligações peptídicas e formação de ligações inter e intramoleculares.

Considerando-se que os venenos são ricos em proteínas, vislumbrou-se a possibilidade de submetê-los aos efeitos da radiação ionizante, na tentativa de sanar um dos nossos problemas de saúde pública que é o acidente ofídico.

envolvidos nos acidentes ofídicos: o gênero *Bothrops*, devido a sua alta incidência, e o gênero *Crotalus*, devido a sua alta letalidade.

Murata et al., 1990, irradiando o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel brasileira, com diversas doses de radiação, mostrou que a dose de 2.000Gy era a adequada no sentido de combinar diminuição de toxicidade com manutenção das propriedades imunológicas, quando testadas em camundongos, coelhos e cavalos.

Ainda nesta linha de pesquisa, Guarneri, em 1992, usou os raios gama para destoxicar o veneno de *B. jararaca*, e, à semelhança do que foi encontrado para

anticorpos quando injetados em animais. Cabe ressaltar, ainda, que os anticorpos formados contra estes agregados são capazes de neutralizar tanto os efeitos da crotoxina isolada quanto aqueles promovidos pelo veneno total de cascavel.

Estes achados apontam a radiação ionizante como uma excelente ferramenta a ser empregada na destoxicação de venenos, por ser uma metodologia capaz de modificar um componente sem acrescentar qualquer substância ao mesmo, como ocorre com a maioria das metodologias que vêm sendo empregadas com o intuito de atenuar a toxicidade de venenos, como, por exemplo, adição de glutaraldeído,



Camundongo inoculado com veneno de jararaca irradiado. Não há qualquer indicio de hemorragia, a qual é perfeitamente visualizada quando o animal recebe veneno não-irradiado.



Camundongo que recebeu inóculo com veneno não-irradiado (nativo). Observa-se nitidamente o local do inóculo (foco hemorrágico).



Camundongo inoculado com crotamina (componente do veneno de cascavel), que promove paralisia flácida muscular no trem posterior. Este efeito é totalmente inibido se a crotamina é irradiada.

Assim, para aumentar a vida útil dos animais utilizados na soroprodução e melhorar a produção de antivenenos para tornar o tratamento hoje apenas disponível para uso humano acessível também aos animais domésticos, têm sido feitos estudos envolvendo a irradiação de venenos com o objetivo de destoxicá-los.

A Supervisão de Radiobiologia do IPEN vem, desde o início da década de 80, estudando os dois principais gêneros en-

cascavel, a dose de 2.000Gy foi a ideal para destoxicar este veneno com manutenção de suas propriedades imunológicas, conforme mostraram os experimentos bioquímicos, biológicos e imunológicos.

Recentemente, Nascimento et al., estudando a crotoxina, principal toxina do veneno de cascavel, tanto pela prevalência quanto pela toxicidade, mostrou que a irradiação desta toxina isolada resultou na formação de agregados de alto peso molecular, assim como produtos de baixo peso molecular em função das quebras promovidas pela radiação.

Após estudos específicos sobre estes agregados, comprovou-se que eles são os responsáveis pela diminuição da toxicidade da crotoxina, que após a irradiação se mostrou duas vezes menos tóxica que a toxina não-irradiada (nativa). Além do mais, por apresentarem alto peso molecular, estes agregados têm sido utilizados para imunização de animais, sem, entretanto, acrescentar-se qualquer adjuvante à mistura a ser inoculada. Isto é uma grande vantagem, pois sabe-se que os adjuvantes até hoje utilizados são altamente tóxicos aos animais (Bennett et al., 1992).

Estes produtos de alto peso molecular, quando isolados por métodos bioquímicos, se mostraram totalmente atóxicos, e o que é melhor, capazes de induzir formação de

inibidores de centro ativo etc.

Por outro lado, a radiação ionizante ainda apresenta uma outra vantagem que é a possibilidade de ter seus efeitos modulados através da utilização de scavengers, conforme mostrado por Andriani em 1995. Estes produtos, conforme descritos anteriormente, têm a capacidade de interagir com as espécies reativas formadas durante o processo de irradiação, impedindo-as de reagir com a amostra que está sendo irradiada.

Exemplificando, de acordo com os achados da autora supracitada, a espécie reativa elétron aquoso não alterou a atividade enzimática da toxina estudada (crotoxina), porém causou modificações estruturais na proteína irradiada; enquanto que o radical hidroxila alterou a atividade enzimática, mantendo, entretanto, a estrutura protéica intacta. Nenhuma das espécies reativas, neste experimento, estavam envolvidas com a atividade tóxica do veneno.

Estas informações reforçam a possibilidade de um controle dirigido do efeito da radiação, por meio do uso de scavengers e estimulam ainda mais o uso da radiação ionizante para destoxicar venenos que, uma vez desprovidos de toxicidade, poderiam inclusive ser usados em um esquema de vacinação dos animais expostos aos riscos de acidentes ofídicos.

A biomédica Nanci do Nascimento inoculando um camundongo com veneno de cascavel irradiado, para testar a atividade tóxica do veneno.



Sangria de camundongo imunizado com veneno irradiado, para pesquisa de anticorpos

Fotos: arquivo do autor.