



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**IRRADIAÇÃO DA CROTOXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA:
INFLUÊNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS
NAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, BIOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS**

ERIKA PAULA ANDRIANI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre 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

**IRRADIAÇÃO DA CROTOXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA:
INFLUÊNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS
NAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, BIOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS**

ERIKA PAULA ANDRIANI



**Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear**

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO

1995

Dedico esse trabalho a você **Nanci** que me transmitiu seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida com dedicação, carinho e preciosa amizade. A você que me levou além das teorias e das técnicas, expresseo o meu maior agradecimento e profundo respeito, que sempre serão poucos diante do que me foi oferecido.

Aos meus pais, **Antonio Domingos Andriani** e **Nadir Juliani Andriani**, que renunciaram muitos de seus sonhos, para que, eu pudesse realizar o meu. A vocês, pais por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo, mas é o que acontece agora, quando procuro sofregamente uma forma verbal que dificilmente traduziria meu sentimento ímpar por vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero, orientador deste trabalho, pela confiança e todo apoio dispensado.

Ao Dr. Spero Penha Morato, Superintendente do IPEN, Pela oportunidade de trabalhar neste Instituto.

A Dra. Vânia Caira Borghi e Dr. Heitor Andrade Jr. pelas sugestões durante o Seminário de Área.

Aos amigos Nanci, Luciana e Bruno pela revisão desta dissertação e por todo apoio ao longo do trabalho.

Ao amigo Patrick, pela colaboração nas elaborações, discussões e sugestões durante os experimentos, e a quem devo parte deste trabalho.

A Luciana, por nossa convivência e amizade, por sua paciência e total apoio sempre e em qualquer situação; a você, não bastaria um muito obrigada.

A amiga Tânia, pelo carinho, apoio e amizade. Sem sua companhia e força, os momentos difíceis seriam mais difíceis, e os alegres não teriam a mesma graça.

Ao amigo Johnny, pela grande paciência, apoiando nos bons e maus momentos e, principalmente, por nossa amizade.

A todos queridos amigos do TB, pela amizade, ótimo convívio e que se ligaram a mim pelo vínculo da experiência comum e nunca serão esquecidos.

Ao meu esposo Fernando Roma, que, mesmo distante, ficou sempre ao meu lado, incentivando-me a prosseguir sempre.

Em especial à todo "Grupo de Venenos", pela cooperação, amizade e apoio imprescindível.

Aos funcionários do TB, que devem acreditar que na cadeia da vida são todos elos igualmente valiosos, porque todos são igualmente necessários.

A você André, pelo ombro amigo e valiosa atenção na fase final deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro concedido.

**IRRADIAÇÃO DA CROTOXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA: INFLUÊNCIA
DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS NAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, BIOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS**

ERIKA PAULA ANDRIANI

RESUMO

A radiação ionizante tem sido utilizada com êxito na destoxicação de venenos ofídicos com a vantagem de não alterar significativamente suas propriedades antigênicas e imunogênicas, sendo eficiente método para uma otimização no processo de produção de anti-soro. Sabe-se que as principais espécies reativas, radical hidroxila (OH^{\bullet}) e elétron aquoso (e^{aq}), formadas no processo de radiólise da água durante a irradiação em solução, atuam sobre a molécula protéica causando notórias modificações. Com o intuito de aprimorar os conhecimentos deste mecanismo, o presente estudo foi feito comparando-se a crotoxina, principal toxina do veneno de *C. d. terrificus*, na sua forma nativa e após irradiação gama na dose de 2.000 Gy, em presença ou não de substâncias "scavengers" que competem especificamente pelas principais espécies reativas, tendo como abordagem os aspectos estruturais, biológicos e imunológicos desta toxina. Os resultados de SDS-PAGE, HPLC, atividade tóxica e enzimática sugerem que o radical hidroxila foi o responsável pela diminuição da atividade enzimática, enquanto o elétron aquoso promoveu alterações de cunho estrutural. A atenuação da toxicidade ocorreu tanto na presença quanto na ausência destas espécies reativas, sugerindo a existência de uma outra espécie responsável por este efeito. A proteína irradiada preservou sua imunogenicidade, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes. A maior capacidade neutralizante foi alcançada com os soros anti-crotoxina irradiada com DTT e cisteína.

**IRRADIATION OF CROTOXIN IN AQUEOUS SOLUTION: ROLE OF THE
MAIN REACTIVE SPECIES IN STRUCTURAL, BIOLOGICAL AND
IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS**

ERIKA PAULA ANDRIANI

ABSTRACT

Ionizing radiation has been successfully used in the detoxification of snake venom, maintaining its antigenic and immunogenic properties, representing an efficient way to optimize anti-sera production. The main reactive species resulting from water radiolysis induced by radiation, namely hydroxyl radical (OH^\bullet) and aqueous electron (e^-_{aq}), act on the protein molecule leading to several modifications. Intending to improve the knowledge of these mechanisms, the present work compared crotoxin, the main toxin of *C. d. terrificus* venom, in its native and irradiated with 2.000 Gy forms, in the presence or not of specific free radical scavengers on what refers to structural, biological and immunological aspects. SDS-PAGE, HPLC, toxicity and enzymatic activity data suggest that hydroxyl radical is involved in enzymatic activity attenuation while aqueous electron promotes structural modifications. Toxicity attenuation occurs in the same manner either in presence or not of these radicals, suggesting the influence of another reactive species in detoxification process. The irradiated protein preserved its immunogenic properties, inducing antibodies able to neutralize the intact native crotoxin. The highest neutralizing capacity was reached with the irradiated anti-crotoxin sera with DTT and cysteine.

ÍNDICE

	Página
I-INTRODUÇÃO	1
II-OBJETIVO	17
III- MATERIAIS E MÉTODOS	18
 Materiais	18
 Métodos	19
1. Purificação da crotoxina a partir do veneno total.....	19
1.1. Cromatografia de exclusão molecular.....	19
1.2. Precipitação da crotoxina no ponto isoelétrico.....	20
2. Dosagem de proteínas.....	21
3. Irradiação da crotoxina.....	22
3.1. Preparo das amostras.....	22
3.2. Irradiação.....	23
3.3. Cálculo do rendimento (G) da irradiação.....	24
4. Critérios de pureza.....	24
4.1. Imunoeletroforese.....	24
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS).....	26
4.2.1. EGPA-SDS na ausência de agente redutor.....	26
4.2.2. EGPA-SDS na presença de agente redutor.....	28
4.3. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).....	29
5. Análise das atividades biológica e imunológica.....	31
5.1. Atividade tóxica.....	31
5.2. Atividade enzimática.....	32
5.3. Capacidade imunogênica.....	34
5.3.1. Processo de imunização.....	34
5.3.2. Detecção de anticorpos (ELISA).....	36

5.3.3. Soroneutralização "in vitro".....	37
IV- RESULTADOS	39
1. Isolamento, purificação e irradiação da crotoxina.....	39
2. Cálculo do rendimento (G) da irradiação.....	42
3. Imunoeletroforese.....	43
4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS).....	45
4.1. EGPA-SDS na ausência de agente redutor.....	45
4.2. EGPA-SDS na presença de agente redutor.....	47
5. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).....	48
6. Atividade tóxica.....	57
7. Atividade enzimática.....	60
8. Capacidade imunogênica.....	63
9. Capacidade neutralizante.....	64
9.1. Soroneutralização "in vivo".....	64
9.2. Soroneutralização "in vitro".....	64
10. Resumo dos resultados.....	67
V- DISCUSSÃO	68
VI- CONCLUSÕES	76
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

I-INTRODUÇÃO

O alto índice de acidentes ofídicos ocorridos principalmente entre a população rural e da periferia dos grandes centros, tem sido motivo de grande preocupação no meio científico. Cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos são registrados anualmente no Brasil, onde são encontrados quatro gêneros de serpentes peçonhentas de importância médica: *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), pertencentes à família Viperidae, e *Micrurus* (corais), pertencente à família Elapidae (Cardoso & Brando, 1982; Amaral *et al.*, 1987; Bjardson & Fox, 1988-89;).

O gênero *Crotalus* apresenta uma única espécie no Brasil, a *C. durissus* que distribui-se geograficamente pelas regiões secas e áridas do Nordeste, Leste, Centro-Oeste e Sul do país (Amaral, 1977). Em sua classificação, inclui-se 7 subespécies: *C. d. terrificus* (Laurenti, 1768), *C. d. collilineatus* Amaral, 1926, *C. d. cascavella* Wagler, 1824, *C. d. marajoensis* Hoge, 1966 ; *C. d. ruruima* Hoge, 1965; *C. d. dryinas* Linnaeus, 1758 e *C. d. trigonicus* Harris & Simmons, 1978 (Klauber, 1982; Campbell & Lamar, 1989).

A subespécie *C. d. terrificus* distribui-se pela Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Peru e Brasil (Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (Hoge & Romano-Hoge, 1978-79; Klauber, 1982; Campbell & Lamar, 1989) e é responsável por cerca de 13% dos acidentes ofídicos (Ribeiro *et al.*, 1990) com alto grau de letalidade caso não seja administrado em tempo hábil e em doses e vias adequadas, o soro

anticrotálico, único tratamento de eficácia comprovada (Amaral *et al.*, 1987; Barraviera, 1994).

Os anti-soros para uso humano (soros heterólogos) são medicamentos contendo imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas geralmente a partir de plasma de eqüídeos, hiperimunizados com venenos de animais peçonhentos. Após os processos de purificação e de concentração são feitas as adequações necessárias para que o produto final, sob a forma líquida ou liofilizada, atenda as exigências de potência e de segurança estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (Soerensen, 1990).

A produção de plasma ou soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno e as serpentes do gênero *Crotalus* apresentam veneno com baixa capacidade imunogênica e, por outro lado, alta toxicidade pela presença de componentes neurotóxicos. Isto impede a inoculação de doses capazes de estimularem uma resposta imunológica adequada, além de prejudicar o animal produtor, tendo como consequência uma baixa produtividade de soro (Daniel *et al.*, 1987).

Por estas razões é necessário o desenvolvimento de técnicas que aumentem a resposta imunológica, reduzam a toxicidade do veneno protegendo os animais soroprodutores e baixando o custo dispensado na manutenção dos mesmos. Como consequência, haverá uma melhora acentuada na produção de anti-soro.

O veneno crotálico

Grande parte das vítimas de acidentes envolvendo as serpentes do gênero *Crotalus*, da América do Norte e da América Central, não apresentam sintomas neurotóxicos, como ocorre na América do Sul. Os sintomas e sinais apresentados são locais como dor, edema e hemorragia e sistêmicos incluindo alterações cardiovasculares, respiratórias e urinárias (Owby, 1982). Enzimas de atividade fibrinolítica (Rael *et al.*, 1992; Chiou *et al.*, 1992) e metaloproteinases hemorrágicas com ação direta nas paredes dos vasos sanguíneos (Takeya *et al.*, 1990), foram isoladas dos venenos de cascavéis procedentes destas regiões. Já o veneno da cascavel sulamericana (*C. d. terrificus*), quando testado experimentalmente, apresenta atividade coagulante de pequena intensidade, podendo ser a proteína "trombina-simile", isolada deste veneno, a responsável por esta atividade (Raw *et al.*, 1986). No local da picada observam-se edema discreto e parestesia persistente, enquanto sistemicamente há sintomas miotóxicos e neurológicos como, "facies miastêmico" (ptose palpebral uni ou bilateral e paralisia da musculatura facial), oftalmoplegia, dificuldade de acomodação visual, mioglobínúria e elevação dos níveis séricos de creatina-quinase (CK) (Amaral *et al.*, 1987; Azevedo-Marques *et al.*, 1985). A peçonha de *C. d. terrificus* tem sido bem estudada e alguns componentes já foram isolados e caracterizados, como: crotamina, convulxina, giroxina, delta toxina e crotóxina (Vital-Brazil, 1972).

A crotamina foi isolada pela primeira vez em 1950 por Moura-Gonçalves e Vieira. Trata-se de um polipeptídeo básico contendo 42 resíduos de aminoácidos e três pontes de sulfeto. Possui peso molecular

da ordem de 4800 daltons (Karlsson, 1979) e ponto isoelétrico 10,3 (Moura-Gonçalves & Arantes, 1956). Esta proteína, sequenciada em 1975 por Laure, não apresenta apreciáveis sequências de homologia com as neurotoxinas, toxinas de membrana ou fosfolipases (Karlsson, 1979). A crotamina está presente em venenos de serpentes coletadas nos Estados do Ceará (Schenberg, 1959 a), Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná e na Argentina (Moura-Gonçalves & Vieira, 1950; Schenberg, 1959 b). Tais observações levaram Moura-Gonçalves, em 1956, a sugerir a reclassificação das cascavéis com veneno crotamina-positivo para *Crotalus terrificus crotaminicus*. Nos venenos crotamina-positivos, a quantidade de crotamina presente é cerca de 16,9% do veneno total, determinada pela ligação do negro de amido (corante) com a crotamina (Moura-Gonçalves & Arantes, 1956). A crotamina produz paralisia das patas posteriores e subsequente paralisia respiratória em camundongos (Moura-Gonçalves & Vieira, 1950; Moussatché & Duarte-Vieira, 1953). Sua DL₅₀ para camundongos é de 3,4 mg/kg (Karlsson, 1979). A crotamina provoca, em preparações de diafragma isolado de rato, imediata contratura seguida por contrações espontâneas e irregulares (Cheymol *et al.*, 1971 a, b), sendo que estudos relativos à ação despolarizante da crotamina sobre este músculo, mostraram que esta age sobre o canal de sódio, interferindo na permeabilidade celular (Chiung-Chang & Hong-Tseng, 1978).

A convulxina, uma glicoproteína de peso molecular 72000 daltons, foi isolada e farmacologicamente caracterizada por Prado-Franceschi, em 1970. A toxicidade da convulxina foi estudada em camundongos, gatos, cães e cobaias, nos quais, produz, quando

inoculada via intra-venosa, os seguintes efeitos: convulsões tônico-clônicas, alterações circulatórias (hipotensão seguida de hipertensão) e alterações respiratórias (taquipnéia seguida por intensa dispnéia). Entretanto, Mello *et al.* (1990), observaram que esta toxina, quando inoculada diretamente no hipocampo de rato, não provoca nenhum tipo de convulsão. A convulxina é um potente ativador e agregador de plaquetas na ausência de fibrinogênio. A ação da convulxina sobre a agregação plaquetária é dependente do cálcio e da dose, mas independe de ADP, tromboxano A₂ e trombina. A participação da convulxina nos envenenamentos causados pelo veneno de *C. d. terrificus* ainda não foi esclarecida (Vargaftig *et al.*, 1980; Prado-Francheschi *et al.*, 1981; Prado-Francheschi & Vital-Brazil, 1981; Vargaftig *et al.*, 1983; Sano-Martins & Daimon, 1992).

A giroxina, uma glicoproteína isolada por Barrio em 1961, quando injetada em camundongos via intra-venosa (i.v.) age sobre o sistema nervoso central, causando movimentos giratórios ao longo do eixo longitudinal do corpo (síndrome da lesão labiríntica) e produzindo diminuição da pressão arterial. Alexander *et al.* (1988), observaram que a "trombina-simile", isolada por Raw *et al.* (1986), apresentava peso molecular semelhante e a mesma atividade biológica da giroxina, sugerindo que as duas atividades pudessem ter sido exercidas por uma única proteína. As atividades seriam dependentes da dose, sendo que, a ação girotóxica surgiria quando a proteína fosse administrada em pequenas quantidades.

A delta-toxina é ainda pouco conhecida farmacologicamente, embora uma ação hemoconcentrante tenha sido identificada, por alteração na permeabilidade vascular (Vital-Brazil, 1980).

O principal componente neurotóxico, hemolítico "in vitro" e responsável pela ação miolítica, foi isolado em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat e denominado crotoxina. Possui peso molecular de 23.000 daltons, com ponto isoeletrico de 4,7. Uma forte indicação da não homogeneidade da crotoxina foi mostrada, dezoito anos mais tarde, por Fraenkel-Conrat & Singer (1956) que, tratando a crotoxina com fluorodinitrobenzeno, verificaram a presença de duas subunidades, uma maior e outra menor. Habermann e Rüksamen (1970), submetendo a crotoxina em coluna de carboximetil celulose na presença de tampões ácidos, também obtiveram duas frações. Uma fração fortemente básica, pouco tóxica e com atividade fosfolipásica e outra ácida, não tóxica, sem atividade fosfolipásica. Quando as duas frações eram misturadas, a toxicidade "in vivo" da fração básica era potencializada pela fração ácida, enquanto a atividade enzimática "in vitro" da fosfolipase era inibida.

Hendon e Fraenkel-Conrat (1971), separaram os componentes da crotoxina tanto em DEAE-celulose pH 6,0 na presença de uréia, como também em carboximetil-celulose sem uréia. Rüksamen *et al.* (1971) denominaram a proteína ácida de crotapotina - "*crota*", por ter sido isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*; "*pot*", por potencializar a toxicidade da fosfolipase A₂ "in vivo", e "*in*", por inibir a atividade enzimática "in vitro" da fosfolipase A₂. Alguns autores preferem denominar a crotapotina e a fosfolipase A₂ em "crotoxina A" e "crotoxina B", respectivamente (Habermann & Breithaupt, 1978). Aird *et al.* (1986) descreveram a fosfolipase A₂ sendo básica e rica em resíduos de lisina e arginina e a crotapotina, fortemente ácida. Aird *et al.* (1990), sequenciaram a cadeia "B" da subunidade acídica e

mostraram que esta apresenta 91% de homologia com o segmento correspondente da Mojave toxina, neurotoxina do veneno da serpente *Crotalus scutulatus scutulatus*. Os autores identificaram estar o piroglutamato na porção N-terminal da cadeia, composta de 35 aminoácidos, e obtiveram o mesmo sequenciamento já relatado pelo grupo em 1986, exceção feita ao resíduo da posição 20 onde, pela degradação de Edman, foi encontrada a glicina e através da análise em espectrofotômetro de massa, o resíduo identificado foi o ácido glutâmico.

A crotoxina representa 65-68% do peso total do veneno, com uma DL₅₀ determinada em camundongos não-isogênicos, pela via intra-peritoneal, de 0,070 mg/kg, sendo que a DL₅₀ do veneno total pela mesma via é cerca de 0,090 mg/kg (Hanashiro *et al.*, 1978). O efeito letal da crotoxina tem sido atribuído à sua ação pré e pós-sináptica. Ocorre bloqueio pré-sináptico da transmissão neuromuscular, causando a redução da liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas (Vital-Brazil & Excell, 1971; Chang & Lee, 1977).

Vital-Brazil, em 1966, demonstrou que a crotoxina interrompe a transmissão neuromuscular em preparações de músculo ciático-tibial anterior de cães e gatos. Observou, além disso, que em hemidiafragma de rato a crotoxina não produz contração, induzindo um decréscimo na resposta à acetilcolina. Isso o levou a sugerir que a crotoxina interfere na transmissão neuromuscular, provavelmente reduzindo a sensibilidade da placa motora à acetilcolina (Habermann & Breithaupt, 1978; Bon *et al.*, 1979). Estudos imunohistoquímicos detectaram a presença da crotoxina em junções neuromusculares de músculo estriado de camundongos, mostrando uma ação dependente do

tempo, observando-se junções com estrutura preservada aos 30 minutos e evidente degeneração desta estrutura 60 minutos após o inóculo da toxina (Cardi *et al.*, 1992).

Jeng & Fraenkel-Conrat, em 1978, observaram que a inativação da atividade enzimática da fosfolipase A₂ resultou na perda da toxicidade. Chang *et al.*, em 1977, observaram que a ação de bloqueio da crotoxina sobre a transmissão neuromuscular foi reduzida quando íons de Ca²⁺ foram substituídos por íons de Sr²⁺, um inibidor da atividade fosfolipásica (Bon *et al.*, 1979). Esta observação levou à hipótese de que a fosfolipase A₂ é a responsável por essa ação. Esses autores, trabalhando com preparações pós-sinápticas de eletroplaca de *Electrophorus electricus*, concluíram que tanto a crotoxina como a fosfolipase A₂ bloqueiam a despolarização causada por agonistas colinérgicos. Nestas condições, a crotoxina expressava uma ação dez vezes mais potente que a fosfolipase A₂. A crotapotina não bloqueia a despolarização, mas aumenta a atividade farmacológica da fosfolipase A₂ quando as duas proteínas são usadas conjuntamente. A crotapotina previne a ligação inespecífica da fosfolipase A₂ para sítios de baixa afinidade. Desta forma, os autores demonstraram ação pós-sináptica da crotoxina e da fosfolipase A₂, concluindo que o veneno de *C. d. terrificus* atua tanto pré quanto pós-sinápticamente ao nível juncional (Bon *et al.*, 1979).

A crotapotina, o componente ácido da crotoxina, isolada por cromatografia de carboximetil celulose, apresenta um peso molecular de 8.900 daltons e ponto isoeletrico determinado por focalização isoeletrica de 3,4. Esta proteína é composta por três cadeias peptídicas (A, B e C) unidas por sete pontes de sulfeto. A cadeia "A" contém 40 resíduos de

aminoácidos, a cadeia "B" 34 resíduos e a cadeia "C" 14 resíduos de aminoácidos, podendo apresentar-se como dímero em soluções de baixa força iônica (Breithaupt *et al.*, 1974).

A fosfolipase A₂, o componente básico da crotoxina, tem peso molecular de 14.500 daltons e ponto isoelétrico 9,7. Consiste de uma única cadeia peptídica de 123 aminoácidos (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1980) que formam dobras que se anelam no nível de suas oito pontes de sulfeto (Breithaupt *et al.*, 1974). A fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus* é relativamente tóxica quando comparada com outras fosfolipasas A₂. Sua DL₅₀ em camundongos pela via intravenosa, é cerca de cinco vezes maior que a da crotoxina (0,540 mg/kg) (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Rübsamen *et al.*, 1971).

Estudos histológicos, demonstraram que tanto a fosfolipase A₂ como a crotoxina apresentavam atividade mionecrótica quando doses subletais foram injetadas em camundongos pela via intramuscular (Gopalakrishnakone *et al.*, 1984). O mesmo foi observado, mas em menor intensidade, quando injetaram, nas mesmas condições, o complexo crotoxina reconstituído com a fosfolipase A₂ modificada pelo p-brometo de fenacila. Foi também observada, 72 horas após a injeção da enzima, a presença de mioblastos indicando a regeneração muscular, fenômeno que se completava entre o sétimo e o décimo primeiro dia. Resultados similares foram obtidos por outros autores, utilizando ratos como modelo experimental (Kouyoumdjian *et al.*, 1986).

Gopalakrishnakone & Hawgood (1984), estudaram as alterações morfológicas que ocorrem nos nervos e nas junções neuromusculares de camundongos, induzidas pela injeção da crotoxina. Mostraram que, quando doses letais da proteína eram injetadas pela via intravenosa,

ocorriam alterações nas terminações nervosas do diafragma, incluindo redução na população de vesículas sinápticas; alterações morfológicas no axolema e aumento de tamanho das mitocôndrias. Estas mudanças estão associadas aos sinais clínicos de desenvolvimento da paralisia muscular durante a intoxicação sistêmica. Não foram observadas alterações pós-sinápticas ou miofibrilares no estágio de parada respiratória. Quando a crotoxina foi injetada pela via intramuscular, em doses subletais, os autores observaram, no início da mionecrose, a desorganização da placa terminal, o envolvimento das terminações axônicas pelas células de Schwann e as alterações estruturais axoplasmáticas do nervo pré-terminal.

Métodos de atenuação / Radiação gama

Os venenos podem perder sua atividade tóxica e, entretanto, conservar as suas características imunológicas com capacidade de, quando introduzidos num organismo, induzirem a formação de anticorpos. Com a destoxicação este produto recebe o nome de anaveneno e pode ser utilizado satisfatoriamente na imunização de cavalos com resultados equivalentes aos da imunização com venenos não tratados, sem maior dano para o animal (Costa *et al.*, 1985; Soerensen, 1990).

Vários métodos químicos e físicos foram utilizados na tentativa de destoxicar venenos de diferentes espécies de serpentes. Entre eles, pode-se citar o tratamento com agentes quelantes (Goucher & Flowers, 1964; Giroux & Lachmann, 1981; Higashi *et al.*, 1989), formalina (Sawai, 1979; Aung-Khin *et al.*, 1980; Baride *et al.*, 1980;);

glutaraldeído (Possani *et al.*, 1981; Relyveld & Ben-Efraim, 1983; Guidolin *et al.*, 1989), iodo (Heneine *et al.*, 1988; Bicalho *et al.*, 1990), tanino (Okonogi *et al.*, 1979), formaldeído e calor (Costa *et al.*, 1985), carboximetil celulose (Moroz *et al.*, 1963), foto-oxidação na presença de azul de metileno (Kocholaty *et al.*, 1968), radiação x (Flowers, 1966) e ultravioleta (Tejasen & Ottolenghi, 1970).

A maioria dos métodos citados não foi eficaz na combinação de altos níveis de atenuação com manutenção da imunogenicidade dos venenos, entretanto, alguns obtiveram resultados satisfatórios. Dentre os que podemos destacar estão os trabalhos de Tejasen & Ottolenghi (1970) que estudaram o veneno de *Agkistrodon piscivorus* obtendo redução da toxicidade e inativação das atividades fosfolipásica, proteinásica e fosfodiesterásica, com manutenção da imunogenicidade quando este veneno era submetido à radiação ultravioleta, e Higashi *et al.* (1989) que obtiveram resultados semelhantes utilizando o pré-tratamento de venenos botrópicos com inibidores de proteinases. Baride *et al.* (1980) verificaram mudanças nos parâmetros bioquímicos dos venenos de *Naja naja*, *Bungarus caeruleus*, *Echis carinatus* e *Vipera russelli* submetidos a radiação gama ou formalina, observando a polimerização das proteínas, mas com a preservação da capacidade imunogênica.

A radiação gama também foi utilizada na destoxicação de vários venenos ofídicos por Puranananda (1972), Salafranca (1973), Kankonkar *et al.* (1975) e Herrera *et al.* (1986). Para a mesma finalidade, Heneine *et al.* (1986; 1988) e Daniel *et al.* (1987) utilizaram a técnica de iodação e Guidolim *et al.* (1989), o glutaraldeído; estes autores obtiveram imunógenos adequados de

venenos crotálicos, não ocorrendo o mesmo para venenos botrópicos que apresentaram suas propriedades imunogênicas reduzidas quando submetidos a esses tratamentos.

Dentre as metodologias citadas, a radiação ionizante tem se mostrado uma ótima ferramenta na destoxicação de venenos ofídicos com preservação de suas propriedades imunogênicas e antigênicas (Rogerio, 1978; Baride *et al.*, 1980; Murata, 1988; Souza-Filho, 1988; Hati *et al.*, 1989; Guarnieri-Cruz *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1990; Nascimento, 1991; Guarnieri, 1992; Souza-Filho *et al.*, 1992).

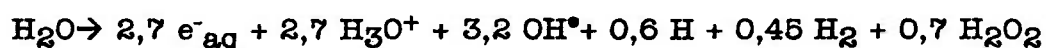
Esta radiação eletromagnética, formada a partir de transições nucleares, tem como características a alta energia associada, ausência de massa, grande poder de penetração e capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propaga (Grosch & Hoopywood, 1979).

A ionização é o processo pelo qual um ou mais elétrons são retirados das camadas externas de um átomo ou molécula, resultando na formação de um par de íons, negativo ou positivo. Na excitação, um elétron de camadas externas de um átomo-alvo absorve energia suficiente para atingir um estado energético mais elevado, permanecendo associado ao átomo e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (Grosch & Hoopywood, 1979). A energia da radiação, inicialmente absorvida através dos processos de ionização e excitação, é transferida para outros átomos e moléculas produzindo várias espécies reativas, principalmente radicais livres.

A irradiação de proteínas em solução aquosa tem sido utilizada, com muita frequência, por proporcionar os mesmos efeitos da irradiação à seco, com o uso de doses menores de radiação

(Lauhatiranananda *et al.*, 1969; Puranananda *et al.*, 1976-77). Nestas condições, o efeito indireto é predominante, tornando as espécies reativas da água particularmente importantes (Draganic & Draganic, 1971).

A reatividade das espécies radical hidroxila (OH[•]) e elétron aquoso (e⁻aq) formadas é tão grande que, entre 10⁻¹⁴ e 10⁻¹² segundos, poderão colidir formando espécies reativas secundárias (Gordon *et al.*, 1963; Hart & Anbar, 1970; Butler *et al.*, 1987). As principais espécies formadas, juntamente com seus respectivos rendimentos para 100 eV de energia absorvida (valor de G), destacam a importância destas espécies reativas:



O radical hidroxila é destacado por muitos autores como importante promotor dos danos às macromoléculas (Adams *et al.*, 1972; Chanderkar *et al.*, 1976; Adams & Posener, 1979; Greenstok, 1984; Garrison, 1987; Milligan *et al.*, 1993). 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 (Butler *et al.*, 1987).

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 (Butler *et al.*, 1984; Butler *et al.*, 1987; Garrison, 1987).

As lesões primárias, produzidas pela absorção de energia da radiação, embora distribuídas ao acaso através de toda molécula protéica, podem estabilizar-se em sítios favoráveis por transferência de energia intramolecular e rearranjo (Farragi *et al.*, 1978; Daniel *et al.*, 1987). As reações iniciadas pelas espécies reativas (OH^\bullet e e^-_{aq}) podem induzir mudanças na estrutura primária pela destruição de aminoácidos específicos e quebra de cadeias polipeptídicas; estruturas secundária e terciária, pela desestabilização de pontes de hidrogênio e sulfidríla, 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 conseqüente perda de atividade biológica das proteínas (Derninger & Jung, 1970; Adams *et al.*, 1972; Bisby *et al.*, 1974; Chanderkar *et al.*, 1976; Butler *et al.*, 1987; Garrison, 1987; Guarnieri-Cruz *et al.*, 1990).

A extensão do dano da radiação pode ser estudada e modificada pela adição, no momento da irradiação, de sequestradores ("scavengers") que possuem a capacidade de competir no meio pelas espécies reativas particulares, impedindo a ação das mesmas na molécula (Chanderkar *et al.*, 1976).

Compostos com radicais sulfidrílas, por serem doadores de hidrogênio, são eficientes "scavengers" de radicais OH^\bullet , mesmo em baixas concentrações (Czapski, 1984). Azida sódica, L-histidina (Basu-Modak & Tyrell, 1993), aceto nitrila, álcoois metílico, etílico, butílico e isopropílico (Milligam *et al.*, 1993), iodeto de potássio (Chanderkar *et al.*, 1976), manitol e etanol (Czapski, 1984), íon tiocianato (Adams *et al.*, 1972a; Adams *et al.*, 1972b; Adams & Posener, 1979), DL-Ditiotreitól (DTT) (Nygaard & Simic, 1983; Weiss & Simic, 1988),

cisteína (Chatterjee & Raman, 1993), e álcool butílico terciário (Czapski & Ilan, 1978; Farragi *et al.*, 1978; Adams & Posener, 1979; Czapski, 1984; Costa, 1988) mostraram-se efetivos radioprotetores dependendo das concentrações (10^{-4} a 5 M) e dos sistemas utilizados. Dentre eles, o álcool butílico terciário apresenta algumas vantagens por produzir radicais não reativos e que desaparecem rapidamente do processo (Butler *et al.*, 1984):



Worm *et al.* (1993), também observaram que vários tipos de álcoois podem ser "scavengers" de radical hidroxila durante a irradiação gama, protegendo bactérias *Escherichia coli* de danos provavelmente causados por este radical. Quando o álcool foi apenas incubado junto às bactérias e retirado antes da irradiação, notou-se uma radiosensibilização das culturas que foi diretamente proporcional à hidrofobicidade dos álcoois utilizados.

Como "scavengers" de elétron aquoso destacam-se o oxigênio, que age convertendo hidrogênio e elétron aquoso rapidamente a radicais ânion superóxido em sua forma ácida, e íons nitrato que mostram-se efetivos sequestradores de elétron aquoso mas não de OH^\bullet (Jonah *et al.*, 1976; Greenstock, 1984; Garrison, 1987).

Vários fatores interferem na obtenção do efeito final da irradiação de proteínas, a saber: presença de oxigênio, tipo de fonte de radiação, dose e taxa de dose, temperatura de irradiação, tipo de solvente, presença de gases e radiomodificadores, estado físico, concentração, pH, toxicidade, antigenicidade, e concentração da

amostra. Desta maneira, o efeito final da irradiação de proteínas e, por conseguinte, de venenos ofídicos pode ser diferente, qualitativa e quantitativamente, de acordo com as condições empregadas (Puranananda, 1972; Kankonkar *et al.*, 1975).

Recentemente foi demonstrado que o veneno total de *C. d. terrificus* irradiado na dose de 2000 Gy numa fonte de Cobalto 60 mantinha suas características imunogênicas com diminuição significativa de sua toxicidade (Murata *et al.*, 1990), possibilitando a utilização deste veneno, agora menos tóxico, na imunização bem sucedida de eqüinos. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se crotoxina purificada deste mesmo veneno (Nascimento, 1991).

O presente trabalho vêm contribuir com o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à otimização do processo de produção de soro a partir de venenos irradiados, uma vez que ainda restam inúmeras lacunas no conhecimento do comportamento químico e biológico deste veneno, principalmente após sua exposição à ação das espécies reativas oriundas da irradiação.

II- OBJETIVOS

GERAL:

Obter informações que esclareçam a ação indireta da radiação nas propriedades estruturais, biológicas e imunológicas da crotoxina, procurando modular o fenômeno de atenuação da toxina mais importante do veneno crotálico.

ESPECÍFICOS:

- 1- Verificar a influência de diferentes "scavengers" específicos para as espécies reativas elétron aquoso (e^-_{aq}) e radical hidroxila (OH^\bullet) durante a irradiação.
- 2- Determinar o papel de cada espécie reativa nas modificações estruturais e biológicas da crotoxina.
- 3- Obter anti-soro anti-crotoxina nativa e irradiada na presença ou não de "scavengers" e testar a imunogenicidade dos mesmos.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais:

1. O lote de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, seco e na forma cristalina, foi adquirido no Instituto Butantan de São Paulo e mantido a -20°C . O soro anticrotálico (lote 8902035), produzido pelo mesmo Instituto, com capacidade de neutralização de 1,5 mg de veneno crotálico por mililitro, foi mantido a 4°C .

2. Os animais utilizados nos experimentos (camundongos Swiss), procedentes do biotério da Coordenadoria de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN, foram mantidos em gaiolas com maravalha de pinho, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

3. Os reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade pró- análise.

Convém salientar que toda a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho, esteve disponível na Supervisão de Radiobiologia da Coordenadoria de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN.

Métodos:

1. Purificação da crotoxina a partir do veneno total

1.1. Cromatografia de exclusão molecular

O isolamento da crotoxina foi feito a partir do veneno total de *C. d. terrificus*, por cromatografia de exclusão molecular num sistema de tampão não desnaturante, utilizando gel Sephadex G-75 R (partículas de 40 a 120 μm) com algumas modificações da metodologia empregada por Rogero (1978) e Nakazone *et al.* (1984). Foi utilizada também a resina Sephacryl S-200 HR, na tentativa de otimizar o método.

Procedimento

O gel Sephadex G-75 R fino (Pharmacia Upsalla Suécia) com partículas de 40 a 120 μm , foi previamente hidratado e entumescido em ácido acético 0,1 M pH 3,0 por 24 horas e, em seguida, empacotado em coluna de vidro com dimensões de 100 x 2,8 cm, atingindo uma altura de 80 cm. Foi mantido um fluxo de solução de ácido acético 0,1M pH 3,0 de 0,22 ml/min., sendo colhidas frações de 2,75 ml em um coletor automático LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia), instalado em câmara refrigerada a 4 °C. A calibração da coluna foi feita com Azul de Dextrana (PM 2.000.000, 2 mg/ml) e Azul de Bromofenol (PM 670; 0,2 mg/ml); estes marcadores de peso molecular permitem determinar o volume de exclusão e o volume total da coluna.

O gel Sephacryl S-200 HR foi empacotado em uma coluna XK 26 (Pharmacia) com dimensões de 87 x 2,6 cm, atingindo uma altura de 78 cm. Foi mantido um fluxo de solução de ácido acético 0,1 M pH 3,0 de 0,75 ml/min, sendo colhidas frações de 3 ml em coletor automático LKB-FRAC-200 (Pharmacia), instalado em câmara refrigerada a 4 °C. A calibração da coluna foi feita como anteriormente descrito.

Para cada cromatografia foram dissolvidos 150 mg do veneno total em 4 ml de ácido acético 0,1 M pH 3,0. A mistura obtida foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos (10.000 g), em centrífuga refrigerada Sorvall RC2B e o volume do sobrenadante aplicado nas colunas cromatográficas citadas. A absorvância a 280 nm das frações colhidas foi determinada em espectrofotômetro Zeiss PMQ-II, em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico. As frações referentes ao(s) pico(s) da crotoxina foram reunidas e posteriormente liofilizadas para concentrar a proteína obtida.

1.2. Precipitação da crotoxina no ponto isoeletrico (pI=4,7) (Hendon & Tu, 1979).

Procedimento

Cada 30 miligramas de crotoxina liofilizada foi dissolvida em 4 ml de água destilada, a solução foi filtrada ou acidificada toda vez que apresentava turbidez. Esta amostra foi levada a pH 3,0 em um potenciômetro Incibrás, adicionando-se solução de ácido fórmico 1,0 M e, em seguida, o pI da crotoxina (pH 4,7) foi alcançado por titulação com hidróxido de amônio 0,1 M. A amostra foi então centrifugada a

12.000 rpm por 10 minutos (15.000 g) e o precipitado contendo a crotoxina, ressuspensão em solução salina acidificada a pH 3,0 (NaCl 0,85 %, HCl 0,001 M), e conservado a -20 °C.

2. Dosagem de proteínas

As concentrações protéicas em que se encontravam as amostras de veneno total, crotoxina nativa e crotoxina irradiada com ou sem "scavengers", foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976) antes de qualquer teste realizado. Nesta técnica, a interferência das proteínas com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) em meio altamente ácido, resulta em modificação proporcional da cor, detectável a 595 nm.

Procedimento

O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de CBB em 50 ml de etanol absoluto, seguido da adição de 100 ml de ácido fosfórico 85% e volume suficiente de água bidestilada para completar 1.000 ml.

A reação procedeu adicionando-se a 3 ml do reagente, 100 µl da amostra a ser dosada, diluída em salina 0,15 M, em duplicata. O controle foi feito acrescentando-se salina ao reagente. Após um tempo mínimo de 2 minutos à temperatura ambiente, determinou-se a densidade óptica à 595 nm. Estes valores foram comparados a uma curva padrão obtida utilizando-se albumina bovina em diluições seriadas a partir de 1 mg/ml, de onde resulta uma função linear do

tipo $Y = Ax + B$, sendo "Y" a concentração de proteína, "x" a absorvância da amostra, "A" o coeficiente angular da reta e "B" a intersecção ou constante inicial da reta. Os valores apresentaram alta correlação ($r^2 > 0,98$).

3. Irradiação da crotoxina

3.1. Preparo das amostras

Alíquotas de crotoxina precipitada no pI foram dissolvidas em solução salina acidificada para pH 3,0, filtradas em membrana de nitrocelulose (poro $0,22\mu$) e dosadas colorimetricamente como descrito anteriormente. Estas amostras foram levadas a uma concentração de 2 mg/ml, contendo ou não "scavengers". Como "scavengers" de radical hidroxila e de elétron aquoso foram utilizadas as substâncias citadas na Tabela I.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela I: Substâncias utilizadas como "scavengers" durante a irradiação da crotoxina

Substância	Fórmula química	Concentração (M)	"scavenger" de
Butanol	$(\text{CH}_3)_3\text{COH}$	0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5	OH^\bullet
DTT	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2$	0,005; 0,05	OH^\bullet
Cisteína	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$	0,01; 0,1	OH^\bullet
Formiato de sódio	HCO_2Na	0,01	OH^\bullet e e^-_{aq}
Nitrato de sódio	NaNO_3	0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1	e^-_{aq}
Butanol + nitr.sódio		0,5 but + 0,05 ns	OH^\bullet e e^-_{aq}

3.2. Irradiação

Os produtos das preparações anteriores (item 3.1) foram submetidos aos critérios de pureza descritos no item 4 e posteriormente irradiados de forma homogênea com 2000 Gy em frasco de vidro, utilizando-se raios gama procedentes de uma fonte de Cobalto 60 Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd.), na presença de oxigênio e à temperatura ambiente. As amostras irradiadas foram mantidas a -20°C até a utilização nos ensaios. Alíquotas de crotoxina nativa (não irradiadas) na presença e ausência de "scavengers" foram incubadas, à temperatura ambiente, durante o período de irradiação de

cada amostra e mantidas a - 20 °C até a utilização como referência (controle) nos ensaios.

3.3. Cálculo do rendimento (G) da irradiação

O cálculo de eletrôn-volts (eV) formados nas condições de irradiação descritas no item 3.2, foi feito com base nos experimentos de Kong *et al.* (1980) e Kong *et al.* (1981) que estudaram a capacidade das espécies reativas em causar danos em sistemas biológicos durante a irradiação. Foi considerado que a cada 500 rad/min (5 Gy/min) eram formados $3,13 \times 10^{19}$ eV/l/min, ou seja, $3,13 \times 10^{16}$ eV/ml/min.

O rendimento (G) de elétron aquoso e radical hidroxila durante a irradiação foi feito considerando-se que para cada 100 eV de energia são formados 0,027 e⁻aq (moles/ml) e 0,032 OH[•] (moles/ml).

Para o cálculo da eficiência de cada "scavenger" utilizado, consideramos a concentração dos mesmos frente a quantidade calculada de espécies reativas presentes no meio no momento da irradiação, uma vez que, a relação de competição entre "scavenger" e espécie reativa é equivalente (1:1).

4. Critérios de Pureza e Análise Bioquímica

4.1. Imunoeletroforese (Grabar & Willians, 1953)

Este método foi utilizado para verificar, de forma qualitativa, a capacidade antigênica do veneno crotálico total e das amostras de crotoxina nativa, irradiada na presença ou ausência de "scavengers",

frente ao soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan. Esta técnica substitui a tradicional Imunodifusão Dupla-Radial de Ouchterlony (1958) e apresenta a vantagem de também mostrar se ocorrem diferenças de carga entre as amostras.

Procedimento

Em cada placa de vidro (9 x 9 cm) foram colocados 12 ml de gel de agarose 1% preparado em tampão Tris-barbitúrico pH 8,6. As placas permaneceram em câmara úmida na geladeira por 30 minutos e, em seguida, foram feitos 5 orifícios com 2,5 mm de diâmetro, intercalados entre 4 canaletas (5,7 x 0,3 cm).

As placas foram colocadas em suporte horizontal para eletroforese e, para haver passagem de corrente do polo positivo para o negativo, os extremos de cada placa e o tampão de corrida (Tris-barbitúrico pH 8,6) entraram em contato por 8 camadas de papel de filtro umidificados no tampão. Foram aplicados 10 µl contendo 20 µg de amostras em cada orifício e a corrida procedeu-se a 90 volts e 20 mA por 1 hora, à temperatura ambiente.

Após a corrida, foram aplicados 100 µl de soro anticrotálico diluído 1:12 em cada canaleta e as placas mantidas em câmara úmida e à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término deste tempo, as placas foram lavadas 3 vezes por 20 minutos em salina 0,1 M, secas em estufa a 40 °C, coradas por 5 minutos com CBB-R e descoradas com solução de metanol 45% e ácido acético 10%.

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS) (Laemmli, 1970)

Esta técnica foi utilizada para detectar, através do peso molecular, o grau de pureza da toxina, assim como as possíveis modificações causadas pela irradiação.

4.2.1. EGPA-SDS na ausência de agente redutor

Para obtenção de gel de empilhamento 2,5% em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 e do gel de resolução 13% em tampão Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 foram utilizados os reagentes nas proporções descritas na Tabela II.

As amostras dos picos obtidos nas cromatografias de exclusão molecular utilizando-se o gel Sephadex G-75 R e a resina Sephacryl S-200 HR, assim como o pico correspondente à crotoxina que foi precipitada no seu pI e os padrões de peso molecular conhecidos (incluídos na Tabela III) foram desnaturados em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M; azul de bromofenol 0,1%; SDS 20% e glicerol 10%) à 100°C, em banho-maria, por 3 a 5 minutos.

Foram aplicados 40 µl de amostra contendo 10 µg de proteína em cada poço isolado. Durante a corrida eletroforética (3 horas) foram fixadas as correntes de 30 mA (100 volts) para o gel de empilhamento e 20 mA (90 volts) para o gel de resolução. O tampão de corrida utilizado foi o Tris 0,025 M - glicina 0,192 M pH 8,3.

A coloração do gel foi feita segundo o método de Steck *et al.* (1980) com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,4%; etanol 25% -

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

formaldeído 1% por, no mínimo, 12 horas à temperatura ambiente ou 1 hora à 60 °C e descorado com etanol 25% - formaldeído 1%. A solução de preservação foi a descorante acrescida de glicerol 10%.

Tabela II: Preparação dos géis de poliacrilamida para corrida eletroforética

SOLUÇÕES	GEL EMPILHAMENTO	GEL RESOLUÇÃO
	volume (ml)	volume (ml)
Acrilamida/Bisacrilamida*	2,5	13,0
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5,0	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	3,5
SDS 10%	0,2	0,3
Água destilada	11,3	11,45
TEMED**	0,03	0,03
Persulfato de Amônio	0,1	0,1

* proporção 30:0,8;

**TEMED= N,N,N',N' tetrametil etilenodiamina

Tabela III: Padrões de peso molecular utilizados em EGPA-SDS (SIGMA)

PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (daltons)
Albumina bovina	66.000
Ovoalbumina	45.000
3-fosfato-dehidrogenase	36.000
Anidrase carbônica	29.000
Tripsinogênio	24.000
Inibidor de tripsina	20.100
Lizenzima	14.300

4.2.2. EGPA-SDS na presença de agente redutor

A crotoxina nativa, cuja pureza foi analisada pelas técnicas de imunoeletroforese e EGPA-SDS na ausência de agente redutor, foi irradiada na presença ou não de "scavengers". Considerando-se que alterações estruturais e formação de agregados são freqüentes no processo de irradiação, as amostras foram submetidas à técnica EGPA-SDS com agente redutor para maior precisão na análise morfométrica das mesmas.

A obtenção do gel de empilhamento foi conforme descrito no item anterior e o gel de resolução foi feito em gradiente de 5 a 20% da concentração de acrilamida-bisacrilamida.

As amostras de crotoxina nativa, irradiada com ou sem "scavengers" (como descrito no item 3.2.) e os padrões de peso molecular conhecidos (Tabela III) foram desnaturados e reduzidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125M; azul de bromofenol 0,1%; Beta-mercaptoetanol 5%; SDS 20% e glicerol 10%) à 100 °C, em banho-maria, por 3 a 5 minutos.

O procedimento de corrida e coloração do gel seguiu-se como para a eletroforese na ausência de agente redutor descrito no item 4.2.1.

4.3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Esta metodologia foi utilizada para detectar, através dos perfis cromatográficos, em função do peso molecular (PM) e áreas dos picos, as possíveis modificações conformacionais ocorridas entre as amostras de crotoxina nativa, irradiada sem "scavengers", irradiadas com diferentes "scavengers" e as amostras controle de crotoxina nativa incubadas na presença de "scavengers" durante o tempo de irradiação.

Procedimento

A análise cromatográfica foi realizada em coluna de 600 x 5 mm TOSO HAAS modelo TSK G 3.000-SW apresentando limite de fracionamento de 1 a 300 KD, acoplada a um equipamento Waters, que consta de dois sistemas automáticos de bombeamento, uma bomba injetora, um microcomputador, um detector espectrofotométrico e um registrador.

Todas as amostras cromatografadas foram previamente filtradas em membranas de nitrocelulose (poro 0,22 μ). A coluna, após lavagem com metanol, foi equilibrada com solução de bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0. A calibração da coluna foi feita com padrões de peso molecular conhecidos que permitiram a construção da curva padrão de peso molecular (PM).

As amostras, na concentração de 0,3 mg/ml, e em um volume de 20 μ l foram submetidas à cromatografia sob um fluxo de 1ml/min., à temperatura ambiente. A densidade óptica das frações em 220nm, em sensibilidade 0,05 AUES, e os perfis cromatográficos foram determinados automaticamente pelo detector e registrador acoplados à coluna.

Padrões de peso molecular conhecidos foram aplicados (BSA, ovalbumina, tripsinogênio e fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus*- SIGMA) e a partir do log do PM x volume de eluição obtivemos a reta $Y = AX + B$, com $r = - 0,95$; onde "Y" = log do PM, "X" = volume de eluição, "A" = - 0,14466 e B = 6,62.

5. Análise das atividades biológica e imunológica

5.1. Atividade tóxica

O grau de toxicidade das amostras foi avaliado pela determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos, calculada segundo o manual da World Health Organization, pelo método de Spearman-Kärber (WHO, 1991).

Procedimento

Camundongos machos da linhagem Swiss (18-22 g), divididos em grupos de 4 animais, foram inoculados intraperitonealmente com 200 µl de diferentes concentrações de crotoxina nativa ou irradiada com e sem "scavengers". Os grupos controle receberam 200 µl de solução fisiológica e diferentes concentrações de cada "scavenger" utilizado pela mesma via de inoculação. As concentrações iniciais para cada amostra irradiada foram conseguidas por tentativa-e-erro, tendo como referência a DL₅₀ da crotoxina nativa. O fator de diluição entre as concentrações protéicas de cada grupo foi 1,3.

A sobrevivência dos animais foi anotada 24 e 48 horas após a inoculação das amostras.

Para o cálculo da DL₅₀ foi utilizada a seguinte equação:

$$m = x_{100} \pm d/n (\Sigma r - n/2)$$

Onde: (m) = log da DL₅₀; (x₁₀₀) = log da quantidade de veneno a partir da qual se obteve 100% de mortes para todos os grupos

inoculados com quantidades superiores; (d) = log do fator de diluição; (r) = número de camundongos que morreram em cada grupo; (Σ) = somatória dos r de todas as quantidades de veneno que se encontram entre x_{100} e x_0 inclusive; (x_0) = log da quantidade de veneno a partir da qual se observou 100% de sobrevivência para todos os grupos inoculados com quantidades inferiores; (n) = número de camundongos usados em cada dose.

O cálculo dos limites fiduciais para o valor de DL_{50} foi realizado segundo as equações:

$$V(m) = d^2 / n^2(n-1) \times [\Sigma r (n-r)]$$

O limite fiducial de 95% para m é aproximadamente:

$$m \pm t_{0,05} \sqrt{V(m)}$$

Onde: $t_{0,05}$ para $\Sigma n-1$ graus de liberdade, considerando unicamente os grupos cujas quantidades de veneno provocam morte entre 0 e 100%, excluindo esses valores.

5.2. Atividade enzimática

O teste enzimático da crotoxina foi feito por meio da dosagem da atividade fosfolipásica segundo o método de Gutiérrez *et al.* (1988) modificado. Este ensaio é baseado na atividade hemolítica indireta da fosfolipase A_2 , que catalisa uma reação de hidrólise transformando a lecitina, presente na gema do ovo, em lisolecitina. A lisolecitina reage com as membranas plasmáticas das hemácias, acarretando sua lise. Neste processo, a hemólise indireta é diretamente proporcional à atividade fosfolipásica da amostra.

Procedimento

Foram retirados 0,75 ml de sangue de camundongos por punção cardíaca ou pelo plexo retro-orbital, usando-se como anticoagulante citrato de sódio diidratado. A separação entre soro e hemácias foi feita por centrifugação (1.500 rpm, 10 min., 4 °C); o soro foi retirado e as hemácias ressuspendidas cuidadosamente em salina 0,15 M. Este procedimento de lavagem das hemácias foi repetido por mais 3 vezes e, em seguida, foram separados 0,3 ml da papa de hemácia. A este volume foi adicionado 0,3 ml de gema de ovo diluída 1:4 em salina 0,15 M e mais 0,25 ml de CaCl₂ 0,01 M. Esta mistura foi diluída em 25 ml de agarose 0,8% (em PBS pH 7,4 à 40 °C), finalizando o preparo do gel. Em cada placa de vidro (9 x 9 cm) foram aplicados 12 ml de gel e neste, uma vez solidificado, foram feitos 9 orifícios com 2,5 mm de diâmetro, distantes entre si 3 cm.

Foram aplicados 10 µl contendo 0,3 µg das amostras em cada orifício. As placas foram mantidas em câmara úmida à 37 °C e, após 20 horas, os diâmetros dos halos de hemólise foram medidos. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

A curva padrão de atividade enzimática foi feita utilizando-se diferentes concentrações de fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus* (SIGMA).

5.3. Capacidade imunogênica

5.3.1. Processo de imunização

A produção de anticorpos não seguiu os padrões normais de imunização com o uso de adjuvantes e diferentes períodos de inóculo. Seguiu-se o padrão descrito para determinação de atividade tóxica em camundongos (item 5.1.), com injeção intraperitoneal e sem adjuvantes. As concentrações utilizadas neste processo de imunização estão na Tabela IV. Foi feita uma sangria, pelo plexo retro-orbital no 30º dia após o inóculo, para verificar se a crotoxina irradiada com cisteína, DTT ou butanol+nitrato de sódio estava alterada quanto a capacidade da toxina induzir a formação de anticorpos. Como controle, foi seguido o mesmo esquema para crotoxina nativa e irradiada sem "scavengers" utilizando-se concentrações subletais.

A capacidade de cada soro produzido neutralizar "in vivo" a ação tóxica da crotoxina nativa foi avaliada. Após a sangria, os animais foram divididos em grupos de 12 (n=12) e desafiados com doses de 3, 6, 9 e 12 DL₅₀. As mortes e sobrevividas foram anotadas 48 horas após o desafio.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela IV: Concentração de crotoxina por grupo de animal

GRUPO	cx irr c/ Cis	cx irr c/ DTT	cx irr c/ BUT 0,5M	cx irr sem	cx
4 animais	0,1 M	0,05 M	+ NS 0,05M*	"scavengers"*	nativa*
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
1	2,0	2,0	0,21	0,44	0,084
2	1,54	1,54	0,16	0,29	0,056
3	1,18	1,18	0,12	0,15	0,028
4	0,90	0,90	0,09	0,07	0,014
5	0,70	0,70	-	-	-
6	0,54	0,54	-	-	-
7	0,41	0,41	-	-	-
8	0,32	0,32	-	-	-
9	0,25	0,25	-	-	-
10	0,18	0,18	-	-	-
11	0,15	0,15	-	-	-
12	0,11	0,11	-	-	-
13	0,09	0,09	-	-	-

cx = crotoxina; irr = irradiada

*= para estas amostras não houve produção de anticorpos contra maiores doses devido a morte dos animais

5.3.2. Detecção de anticorpos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- ELISA) (Theakston *et al.*, 1977; Harlow & Lane, 1988)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de detectar no soro de camundongos possíveis anticorpos formados contra crotoxina nativa e irradiada com ou sem "scavengers".

Procedimento

Placas plásticas de microtitulação (Hemobag) foram sensibilizadas com veneno crotálico nativo (1µg/ml em tampão carbonato de sódio 0,05 M; pH 9,6), 100 µl/poço e mantidas em câmara úmida, à 4 °C por 12 horas. Após a lavagem com PBS/Tween (tampão fosfato salina 0,1M - Tween 20 0,05%), 4 vezes, as placas foram bloqueadas com PBS/Tween + BSA 1% em câmara úmida, a 37 °C, por 1 hora e, em seguida, lavadas como descrito anteriormente. Após a lavagem, 100 µl de soros de camundongos previamente imunizados, foram adicionados a cada poço; seguindo-se incubação por 30 minutos em câmara úmida, a 37 °C; lavagem da placa e adição de soro anti-IgG de camundongo produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:1.000 em PBS/Tween + BSA 1%, 100 µl/poço. Após incubação por 30 minutos em câmara úmida, a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e a reação revelada pela adição de orto-fenilendiamina (OPD) 0,02% na presença de 0,0015% de água oxigenada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 5,0; 100 µl/poço. A reação desenvolveu-se por 20 minutos, à temperatura ambiente, em

câmara escura, sendo interrompida pela adição de 50 μ l/poço de solução ácido cítrico 0,2 M.

Como citado no item 5.3.1, os animais imunizados foram sangrados 30 dias após o inóculo. Inicialmente foi feita a detecção de anticorpos ("ELISA") em uma única diluição 1:10 dos soros em PBS/Tween. A partir dos resultados, foram selecionadas as amostras que abrangeram da maior até a menor leitura de cada soro; destes foram feitas diluições 1:10, 1:30, 1:60 e 1:120 para novo teste de detecção e construção das curvas de titulação a partir das médias de cada grupo.

A leitura das placas foram feitas em leitor automático Dynatech-MR, utilizando-se filtro em comprimento de onda de 450 nm.

5.3.3. Soroneutralização "in vitro"

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade dos anticorpos formados contra crotoxina nativa e irradiada com e sem "scavengers", de neutralizarem a atividade tóxica da crotoxina nativa.

Procedimento

Foram separados os soros de cada amostra testada, cuja absorvância em 450 nm foi de 0,2. A cada soro, diluído 1:5 em um volume de 0,5 ml, foram adicionados 0,5 ml de crotoxina nativa em 5 concentrações (0,6; 0,3; 0,18; 0,10 e 0,06 mg/kg), sendo o fator de diluição 1,7. As misturas (crotoxina nativa + anti-soros) foram

incubadas em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos, para permitir que a reação ocorresse. Para cada mistura foram separados grupos de 4 animais. Em cada camundongo, pesando entre 18 e 22 gramas, foram inoculados 200 µl da mistura. Após 24 e 48 horas, foi verificada a sobrevida dos animais.

IV- RESULTADOS

1. Isolamento, purificação e irradiação da crotoxina

A crotoxina foi isolada e purificada como descrito em Materiais e Métodos. Um perfil cromatográfico típico, utilizando gel de exclusão molecular Sephadex G-75 R, de 150 mg de veneno total de *C.d. terrificus* é mostrado na figura 1a. Foram evidenciados quatro picos bem definidos, sendo o terceiro eluído na posição correspondente ao peso molecular da crotoxina. Utilizando a resina Sephacryl S-200 HR foram obtidos perfis cromatográficos semelhantes ao indicado na figura 1b. Neste perfil podemos observar quatro picos, sendo que o segundo eluiu na posição correspondente ao peso molecular da crotoxina. Este último método permitiu, por ter a resina maior resistência mecânica do que o gel, um aumento do fluxo de corrida, obtendo uma separação eficiente em menor tempo.

As frações correspondentes ao pico da crotoxina, nos dois métodos de separação, foram reunidas e liofilizadas, sendo o "pool" estocado a - 20 °C até sua utilização para os testes. Para aprimoramento da purificação, a crotoxina foi precipitada no seu ponto isoelétrico (pH 4,7) e, neste estágio, denominada crotoxina nativa.

A exposição da fração purificada à 2000 Gy em fonte de raios gama, não provocou a formação de precipitados evidentes, diferindo de estudos anteriores (Baride *et al.*, 1980; Souza-Filho, 1988). Esta solubilidade foi conseguida utilizando-se salina acidificada com HCl (pH 3,0) como diluente da crotoxina antes da irradiação. Não houve a

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

formação de precipitados em grande concentração também na irradiação da crotoxina em presença dos "scavengers", ficando entretanto algumas amostras levemente turvas no final do processo. A irradiação não alterou significativamente a concentração protéica das amostras.

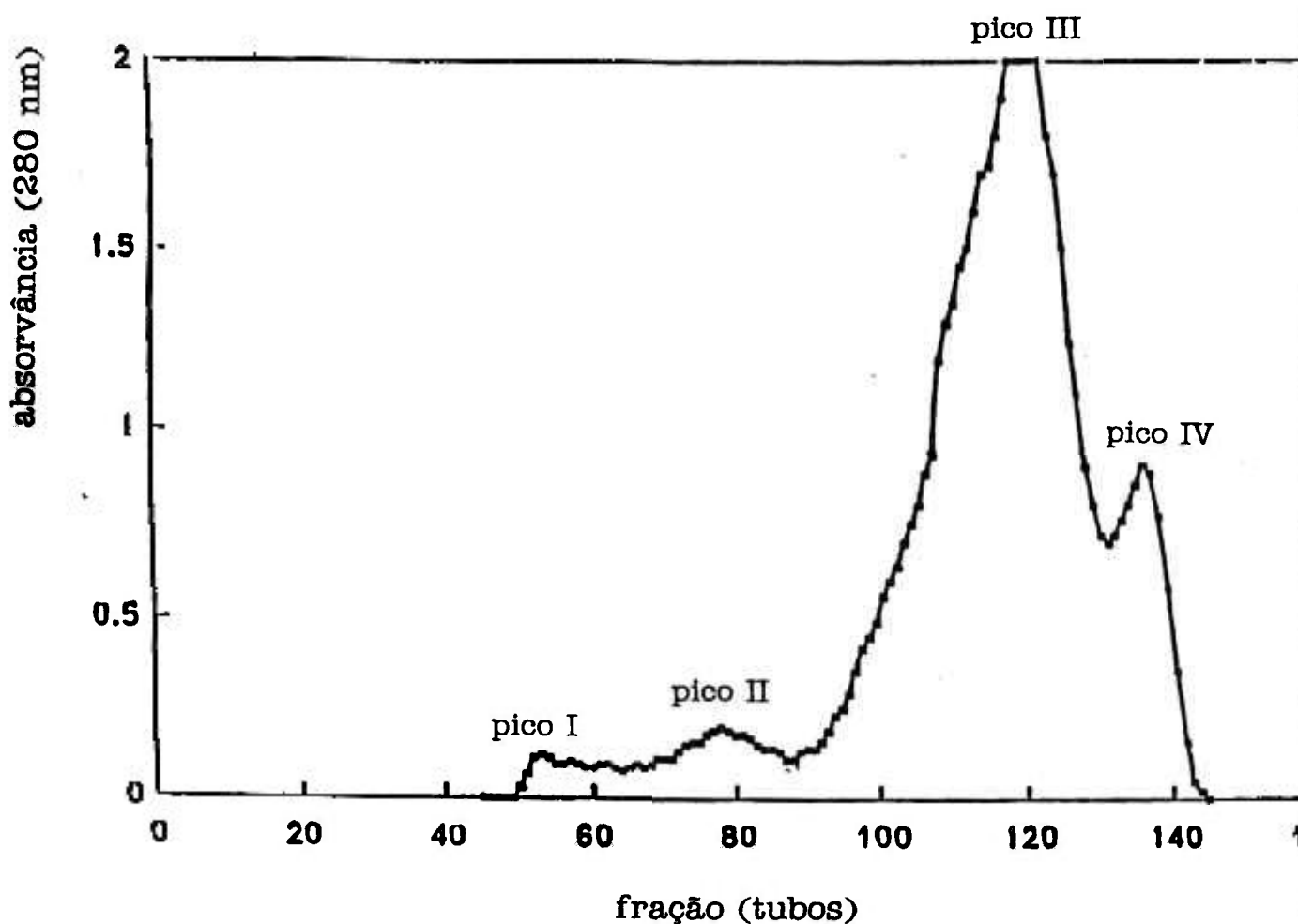


Figura 1a: Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75R

Amostra: Veneno total de *C. d. terrificus*

Pico III: correspondente à fração de crotoxina

Fase móvel: Solução de ácido acético 0,1 M, pH 3,0

Fluxo: 0,22 ml/min

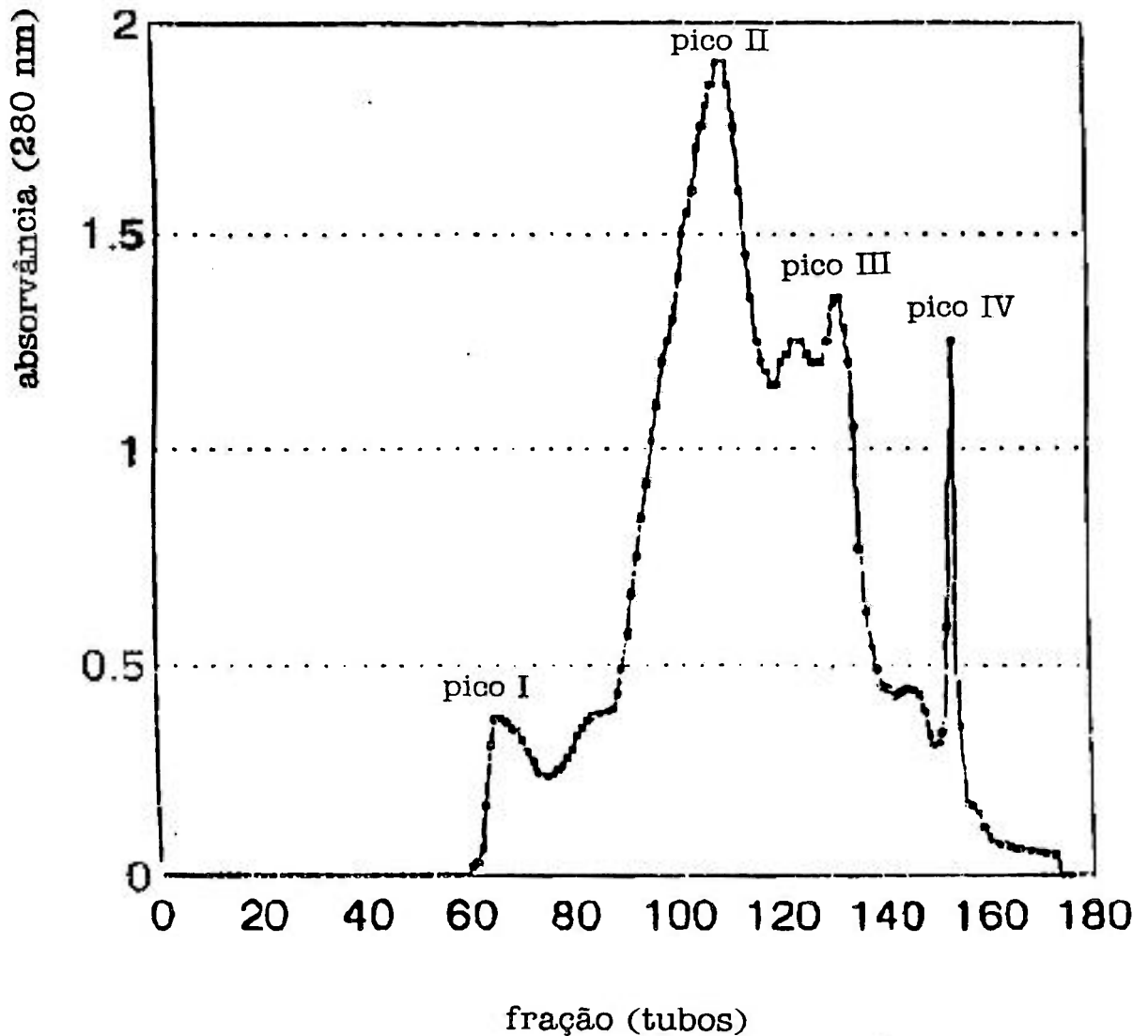


Figura 1b: Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200HR

Amostra: Veneno total de *C. d. terrificus*

Pico II: correspondente à fração de crotoxina

Fase móvel: Solução ácido acético 0,1M pH 3,0

Fluxo: 0,75 ml/min

2. Cálculo do rendimento (G) da irradiação

Considerando-se que para 500 rad/min (5 Gy/min) forma-se $3,3 \times 10^{16}$ e- (eletron-volts (eV)) e que a taxa de dose dos experimentos realizados foi de 813,3 rad/min em 246 minutos (para obtenção da dose de 2000 Gy), foi calculado $1,3204738 \times 10^{19}$ eV durante esse tempo de irradiação.

Para cada 100 eV de energia absorvida são formados teoricamente 0,027 e⁻aq (moles/ml) e 0,032 OH[•] (moles/ml). Assim, para $1,32047388 \times 10^{19}$ eV, temos que:

$$G(e^{-}aq) = 3,565279476 \times 10^{15} e^{-}aq \text{ (moles/ml)}$$

$$G(OH^{\bullet}) = 4,225516416 \times 10^{15} OH^{\bullet} \text{ (moles/ml)}$$

A tabela V mostra as concentrações relativas entre os "scavengers" e as espécies reativas formadas durante o tempo de irradiação. Notamos que as quantidades de todos os "scavengers" ultrapassaram as concentrações necessárias para uma relação 1:1; o que nos leva a supor que 100% das espécies reativas estavam em competição pelos seus respectivos "scavengers", não havendo portanto, interferência das mesmas sobre a proteína irradiada no mesmo meio.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela V: Concentração relativa dos "scavengers" utilizados e espécies reativas formadas

"Scavenger"	Moléculas/ml*	"Scv"/Espécie reativa
Nitr. de sódio 0,01 M	$6,02 \times 10^{18}$	$1,688 \times 10^3$
Nitr. de sódio 0,05 M	$3,01 \times 10^{19}$	$8,443 \times 10^3$
Butanol 1,5 M	$9,03 \times 10^{20}$	$2,137 \times 10^5$
Butanol 0,5 M	$3,01 \times 10^{20}$	$7,123 \times 10^4$
Form. de sódio 0,01 M	$6,02 \times 10^{18}$	$1,425 \times 10^3$
DTT 0,05 M	$3,01 \times 10^{19}$	$7,123 \times 10^3$
Cisteína 0,01 M	$6,02 \times 10^{19}$	$1,425 \times 10^4$

* = Dado: 1M = $6,02 \times 10^{20}$ moléculas/ml (número avogrado)

3. Imunoelektroforese

Pode-se notar nas figuras 2a e 2b que as amostras não apresentaram mudança aparente de carga, mesmo após irradiação com ou sem "scavengers" e que mantiveram a antigenicidade, com exceção da amostra irradiada com formiato de sódio. É interessante notar que

nos orifícios onde foram aplicados veneno total aparecem bandas de precipitação das outras proteínas deste antígeno, além da crotoxina que, representando 65-68% do veneno total, aparece numa banda mais larga. Exceto para a crotoxina irradiada com DTT, nos orifícios onde as amostras de crotoxina (irradiadas ou não) foram aplicadas, uma única banda de precipitação foi evidenciada mostrando um alto grau de purificação desta proteína precipitada no pI. A presença de bandas menos significativas no orifício "g" sugerem a desestruturação da crotoxina quando irradiada na presença de DTT.

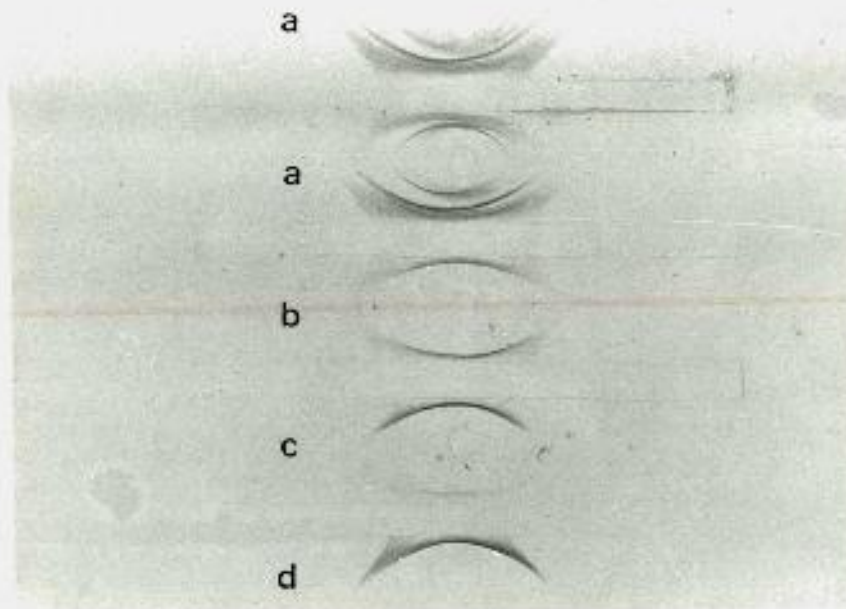


Figura 2a: Imunoeletroforese em gel de agarose

a = veneno total

b = crotoxina nativa

c = crotoxina irradiada sem "scavengers"

d = crotoxina irradiada com butanol (But) 1,5 M

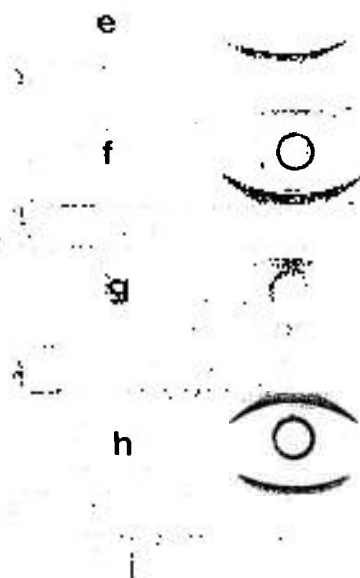


Figura 2b: Imunoeletroforese em gel de agarose

e = crotoxina irradiada com nitrato de sódio (NS) 0,01 M

f = crotoxina irradiada com ns 0,05 M + but 0,5 M

g = crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

h = crotoxina irradiada com cisteína 0,1 M

i = crotoxina irradiada com formiato de sódio 0,01 M

Canaletas (Figuras 2a e 2b): soro anti-crotálico (Instituto Butantan; lote 8902035)

4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS)

4.1. EGPA-SDS na ausência de agente redutor

As amostras submetidas à eletroforese EGPA-SDS não reduzida estão representadas na Figura 3a. A fração cromatográfica referente à crotoxina mostrou sinais de contaminação (amostra d), enquanto que a

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

mesma fração, após precipitação no seu ponto isoelétrico (pI) apresentou banda única (amostra c). As frações correspondentes ao pico I (amostra b) da cromatografia em Sephacryl S-200 HR e aos picos I e II (amostra f) do fracionamento em Sephadex G-75 R, corresponderam a outras proteínas de maior peso molecular do veneno de *C. d. terrificus*. Já a fração correspondente ao pico IV (amostra e) em Sephacryl S-200 HR, representou a proteína de menor peso molecular deste veneno.

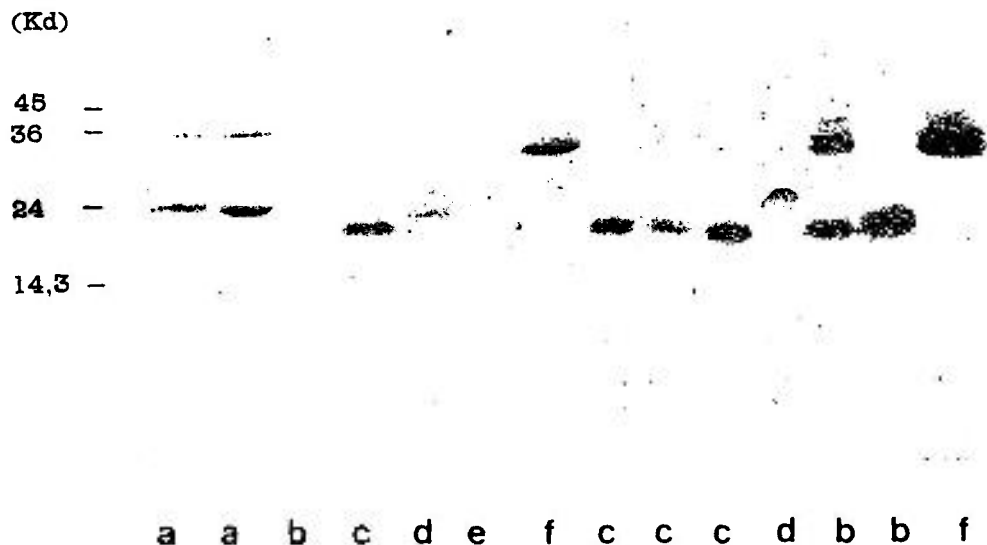


Figura 3a: EGPA-SDS não reduzida - gel 13%

- a= padrões de peso molecular
- b= pico I da cromatografia em Sephacryl S-200 (Fig. 1b)
- c= pico II da cromatografia em Sephacryl S-200 (Fig. 1b), precipitado no ponto isoelétrico (pI) da crotoxina
- d= pico II da cromatografia em Sephacryl S-200 (Fig. 1b)
- e= pico IV da cromatografia em Sephacryl S-200 (Fig. 1b)
- f= picos I e II da cromatografia em Sephadex G-75 (Fig. 1a)

4.2. EGPA-SDS na presença de agente redutor

A eletroforese EGPA-SDS na presença de agente redutor, representada na Figura 3b, mostrou que as amostras de crotoxina irradiadas sem "scavengers" (amostra c), com butanol (amostra d), cisteína (amostra e) e formiato de sódio (amostra f), apresentaram um "arraste" protéico na região de maior peso molecular, sugerindo a formação de substâncias de alto peso molecular durante a irradiação. Por outro lado, as amostras de crotoxina irradiadas com nitrato de sódio (amostra g), butanol + nitrato de sódio (amostra h) e DTT (amostra i), não apresentaram este "arraste" com a mesma evidência. A redução da amostra da crotoxina nativa com β -mercaptoetanol (amostra b) pareceu não ser eficiente, uma vez que foi evidenciada no gel apenas uma das duas subunidades da crotoxina.

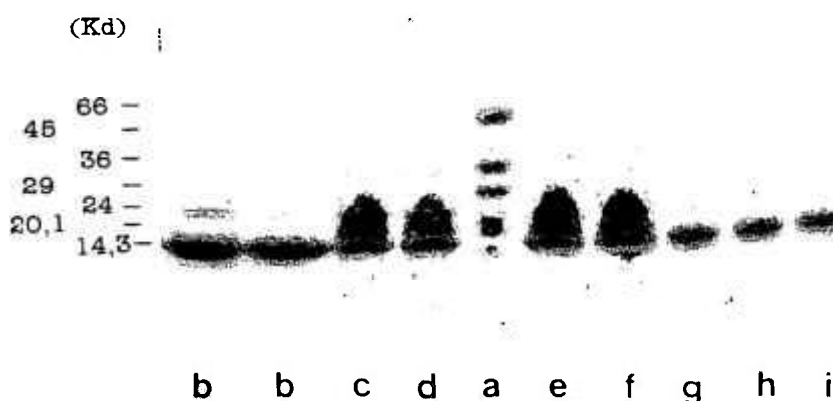


Figura 3b: EGPA-SDS reduzida - gradiente de 5 a 20%

- a= padrões de PM ; b= crotoxina nativa
- c= crotoxina irradiada sem "scavenger"
- d= crotoxina irradiada com butanol 1,5 M
- e= crotoxina irradiada com cisteína 0,1 M
- f= crotoxina irradiada com formiato de sódio 0,01 M
- g= crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,01 M
- h= crotoxina irradiada com nitr. de sódio 0,05 M + butanol 0,5 M
- i= crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

5. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

A reta de calibração da coluna de exclusão molecular utilizada está representada na Figura 4a. Os perfis cromatográficos referentes aos padrões BSA, ovalbumina e fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus* (SIGMA), podem ser observados nas Figuras 4b, 4c e 4d, respectivamente.

O perfil cromatográfico da crotoxina nativa (Figura 4e) mostrou dois picos significantes, tendo apresentado, o primeiro, uma área correspondente a 16,5% da área total e tempo de retenção de 14,4 minutos; este pico também foi observado no padrão de fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus* (Figura 4d). O segundo pico apresentou uma área correspondente a 75% da total, tempo de retenção em 16,32 minutos e foi chamado de pico principal. Na crotoxina irradiada sem "scavengers" (Figura 4f), o primeiro pico teve aumento de 9% de área em relação à nativa, o que mostra a formação de componentes de peso molecular maior durante a irradiação; observa-se também um alargamento do pico principal, sugerindo quebra ou desdobramento da molécula proteica neste processo.

Não houve proteção estrutural da molécula quando irradiada com butanol (Figura 4g); esta permaneceu como a irradiada sem "scavengers", apresentando picos com tempos de retenção e áreas semelhantes. Por outro lado, quando a crotoxina foi irradiada com nitrato de sódio (Figura 4h), "scavenger" de e⁻aq, o perfil obtido foi muito próximo ao da forma nativa. Na irradiação da crotoxina com nitrato de sódio e butanol juntos (Figura 4i) o perfil cromatográfico e a

área do pico principal permaneceram semelhantes à crotoxina nativa parecendo haver proteção da estrutura proteica durante a irradiação. As amostras controle de crotoxina incubadas com os "scavengers" já citados mostraram o mesmo comportamento da amostra nativa.

O uso de formiato de sódio, "scavenger" de OH^\bullet e e^-_{aq} , junto à crotoxina promoveu, após irradiação (Figura 4j), uma diminuição de 40% da área do pico principal em relação a forma nativa e de 15% em relação a amostra irradiada sem "scavengers"; além disto ocorreu um alargamento deste pico, sugerindo desestruturação durante a irradiação na presença desta substância.

DL-Ditiotreitol (DTT), usado como "scavenger" de OH^\bullet , promoveu um aparente rompimento de pontes na molécula antes da irradiação (Figura 4k) e, durante a irradiação as moléculas danificadas pela atuação do DTT se agregaram formando complexos de maior peso molecular e um perfil semelhante ao da crotoxina irradiada sem "scavengers" (Figura 4l). A cisteína, "scavenger" de OH^\bullet , desdobrou a molécula de modo idêntico ao DTT (Figura 4m). Mais uma vez, observou-se após a irradiação, complexos de maior peso molecular (Figura 4n), sugerindo um mecanismo semelhante de atuação dos radicais livres nestes dois casos.

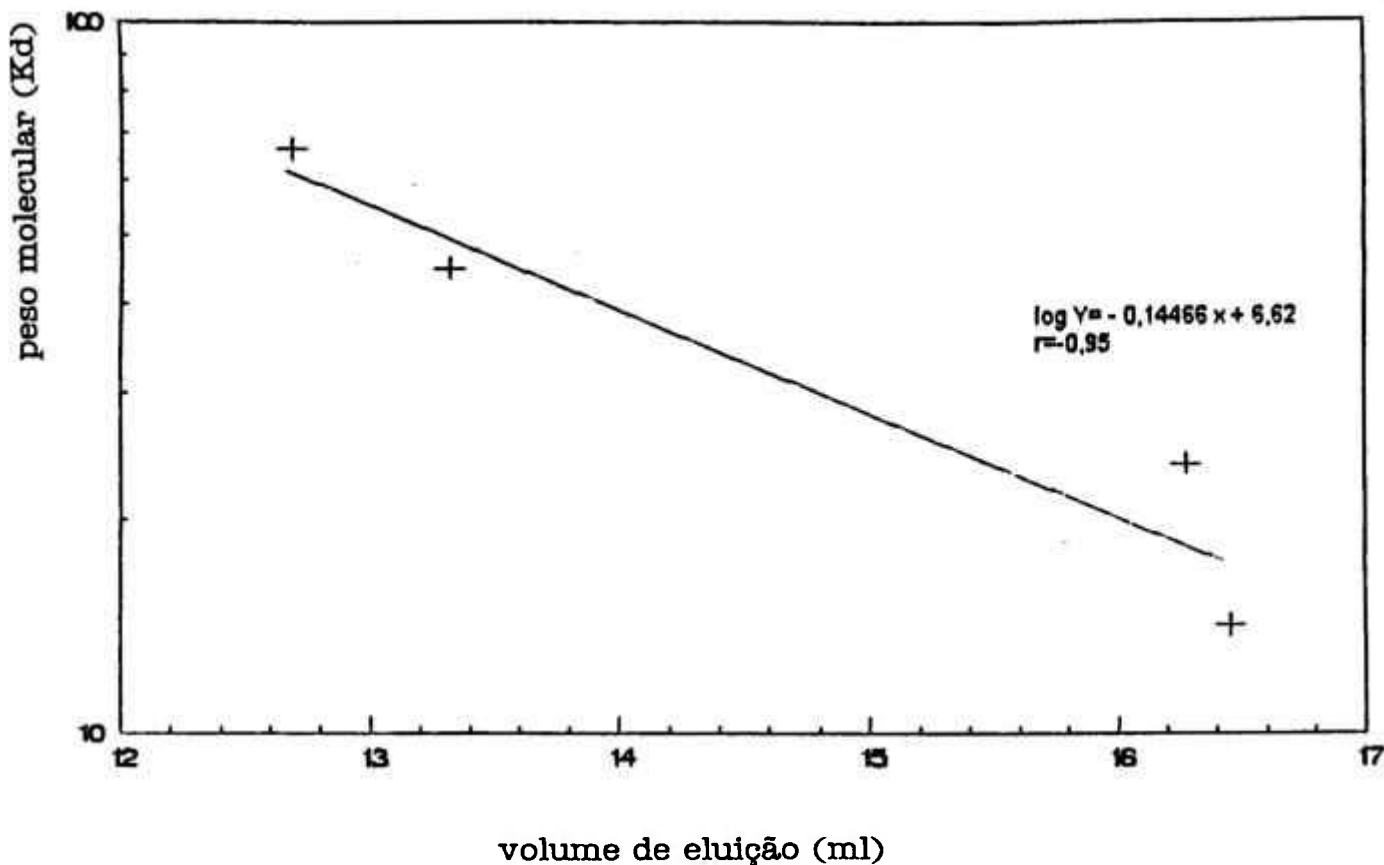


Figura 4a :Reta de calibração da coluna de exclusão molecular

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x8 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo= 1ml/min

$\lambda = 220\text{nm}$

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

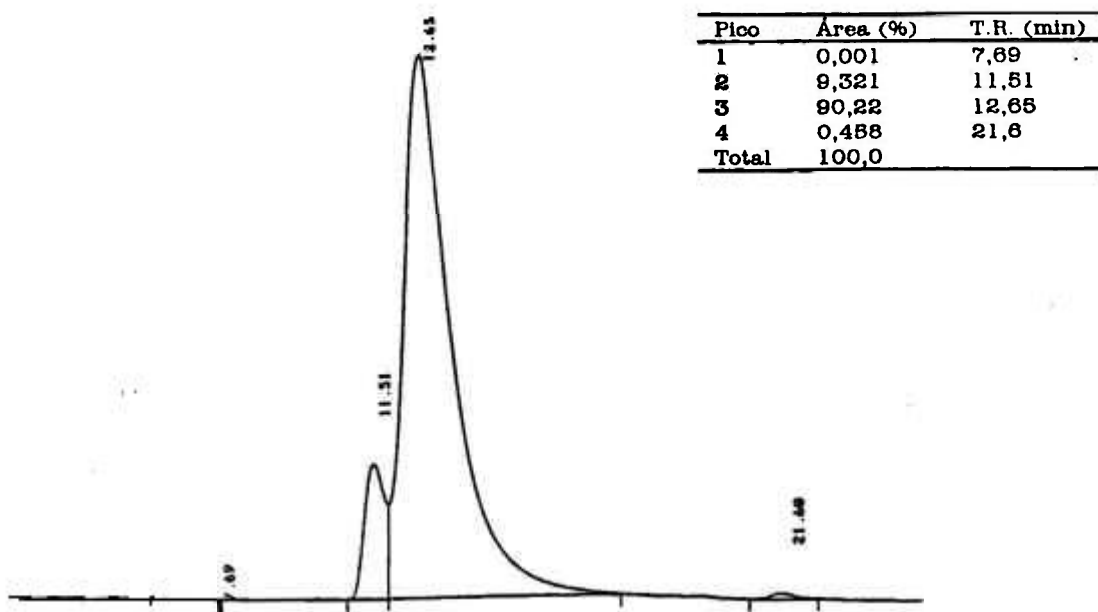


Figura 4b: Cromatografia de soroalbumina bovina (BSA)

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo= 1 ml/min $\lambda = 220$ nm

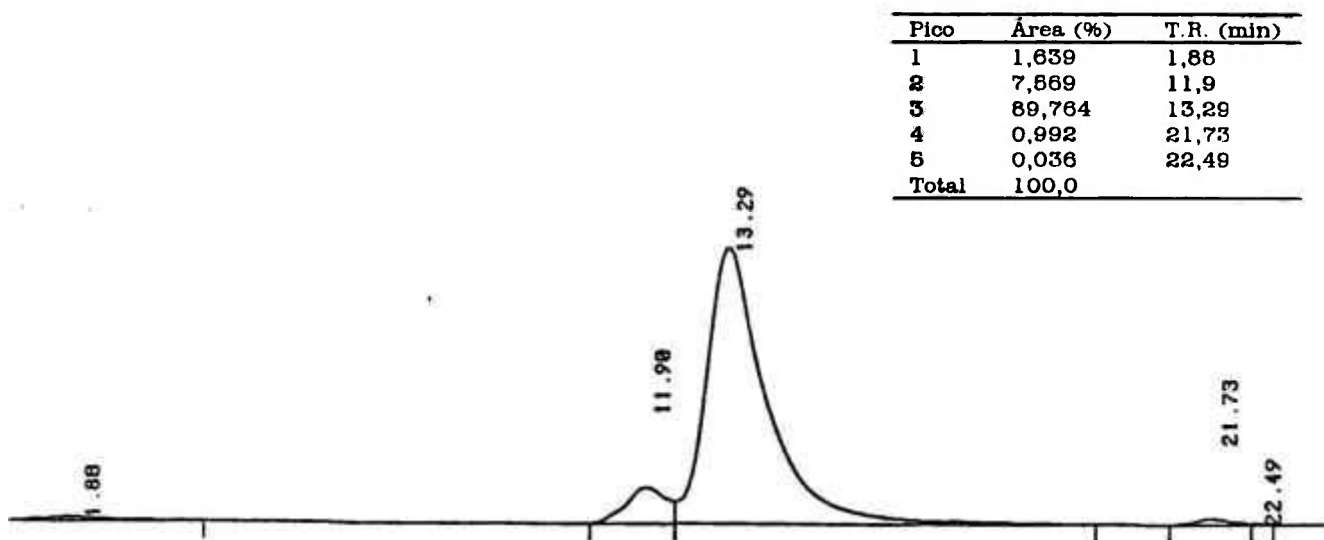


Figura 4c: Cromatografia de ovalbumina

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025M pH 6,0

Fluxo= 1 ml/min $\lambda = 220$ nm

Irradiação da crotocina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

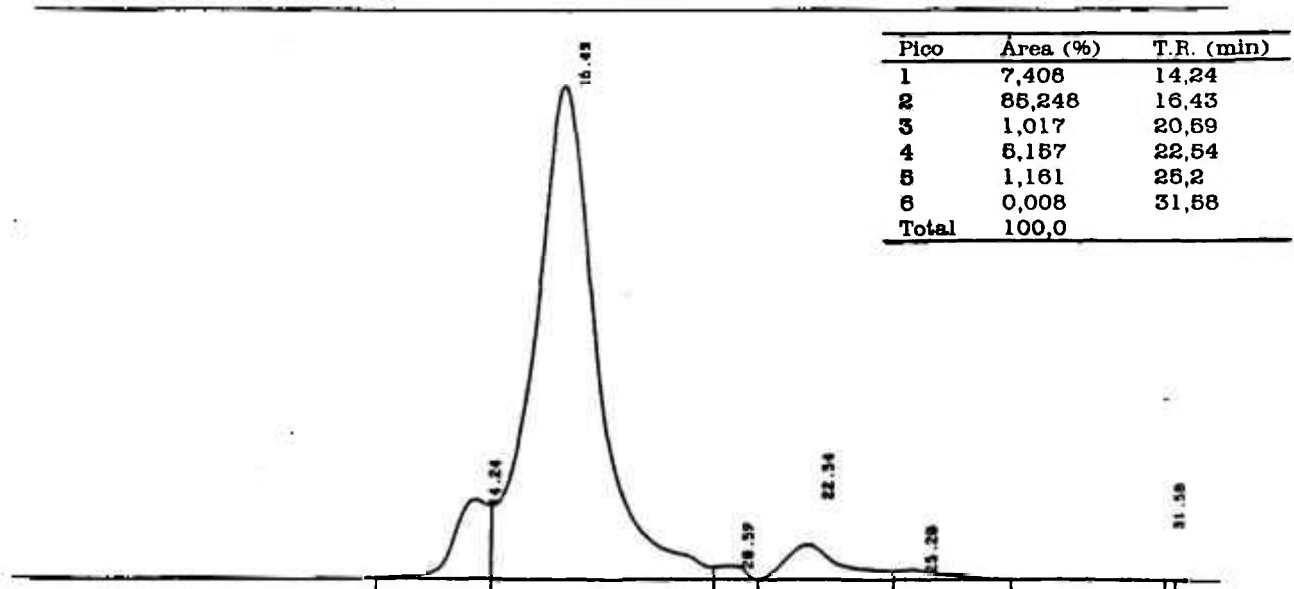


Figura 4d: Cromatografia de fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus*

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo= 1ml/min $\lambda = 220 \text{ nm}$

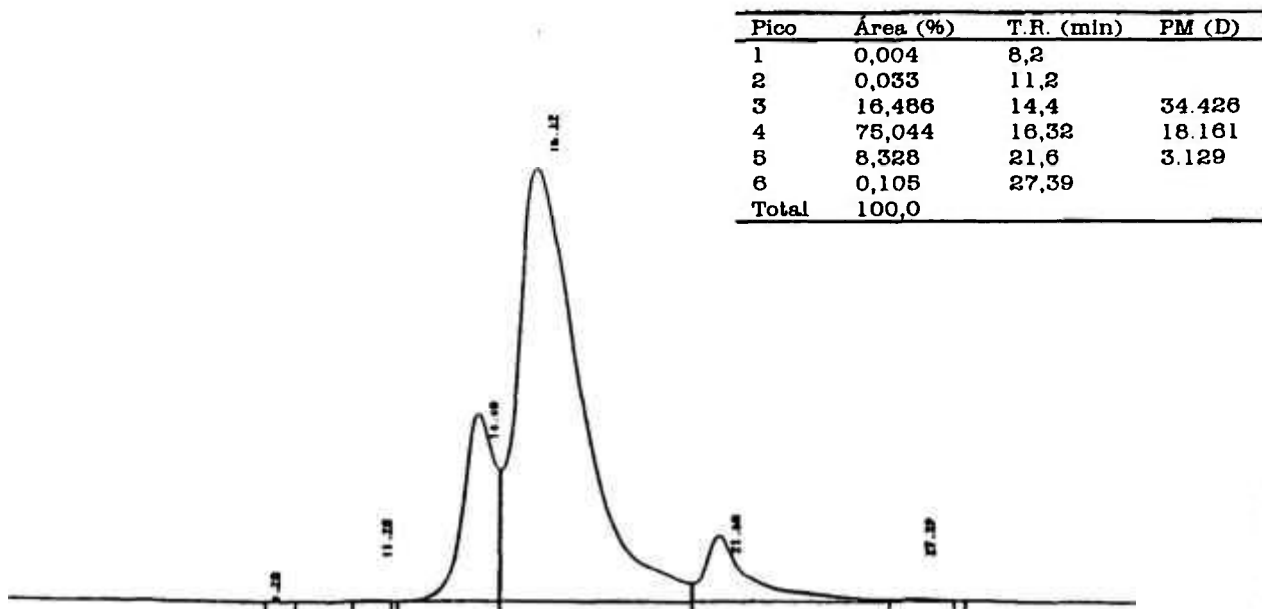


Figura 4e: Cromatografia de crotocina nativa

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220 \text{ nm}$

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

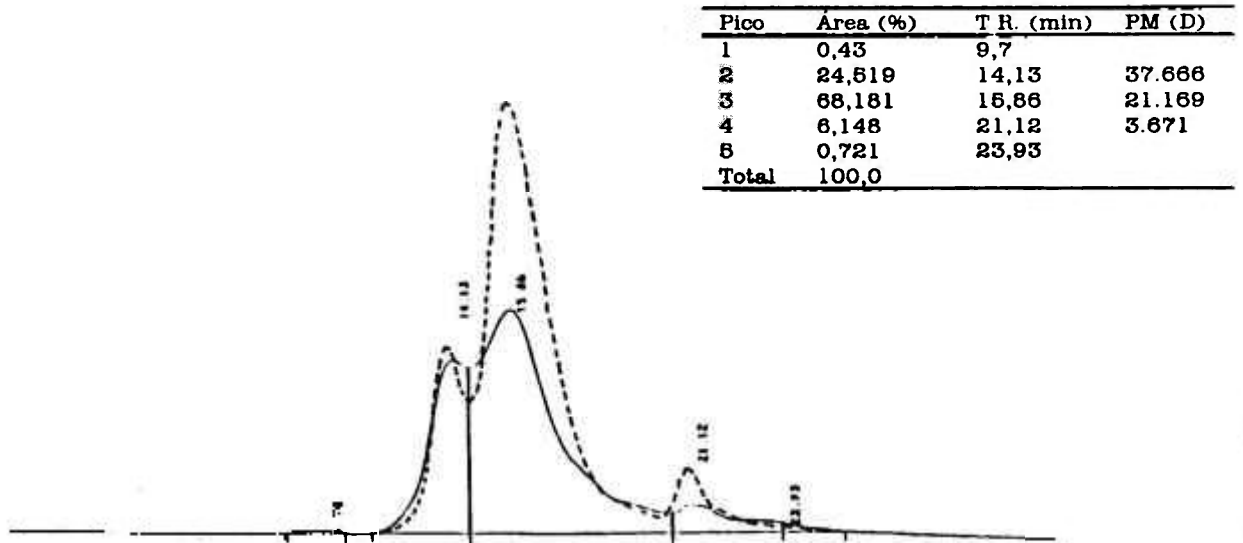


Figura 4f: Cromatografia de crotoxina irradiada s/ "scavengers"

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm
 Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

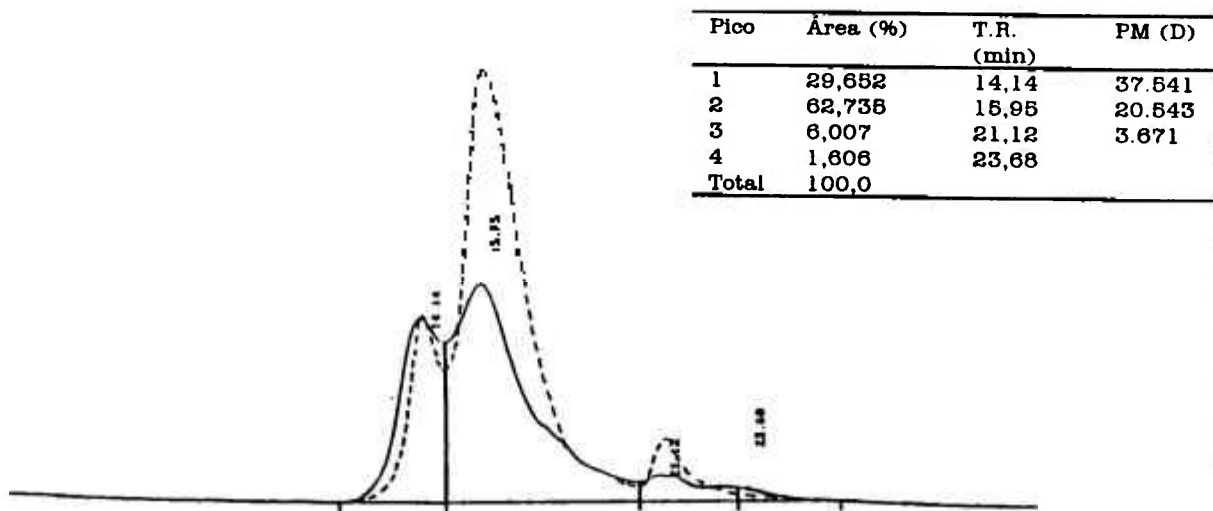


Figura 4g: Cromatografia de crotoxina irradiada com butanol 1,5M

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Coluna: TOSO HAAS TSK 3000- SW 600x5 mm
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

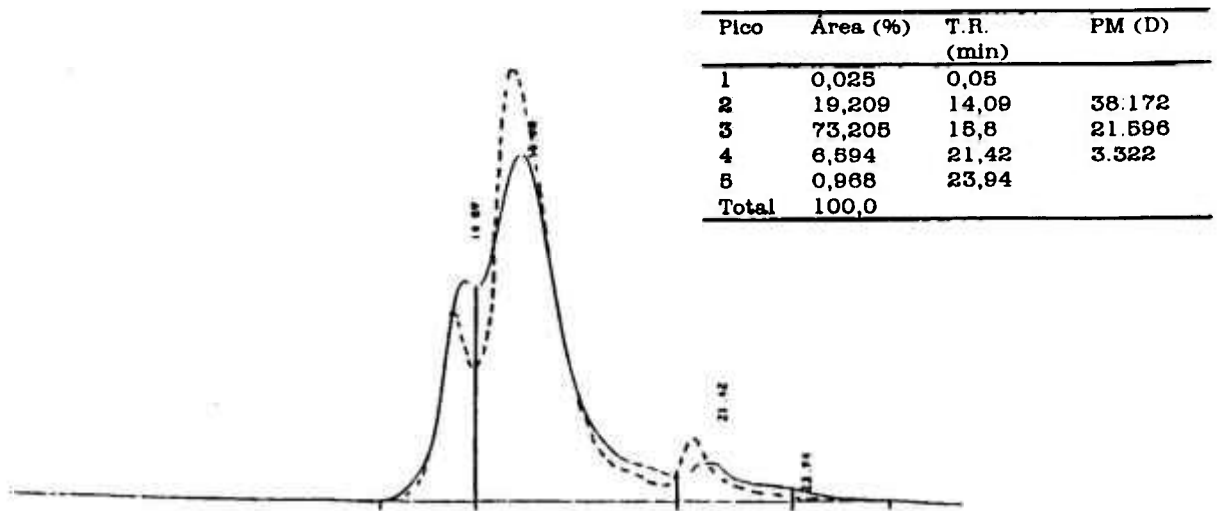


Figura 4h: Cromatografia de crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,01M

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm
 Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

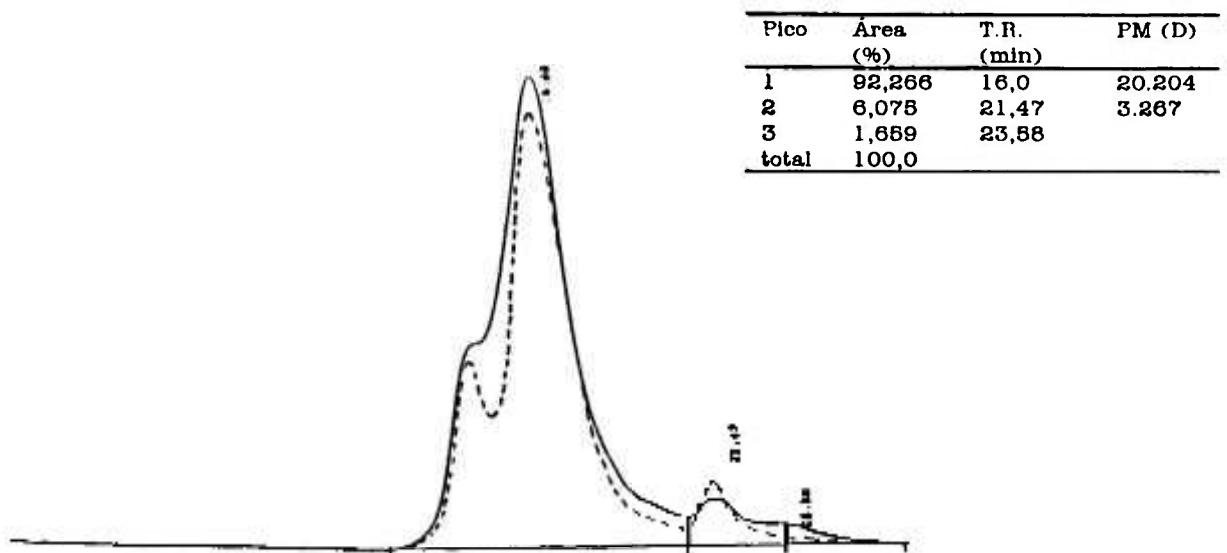


Figura 4i: Cromatografia de crotoxina irradiada com butanol

0,5 M + nitrato de sódio 0,05 M
 Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm
 Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

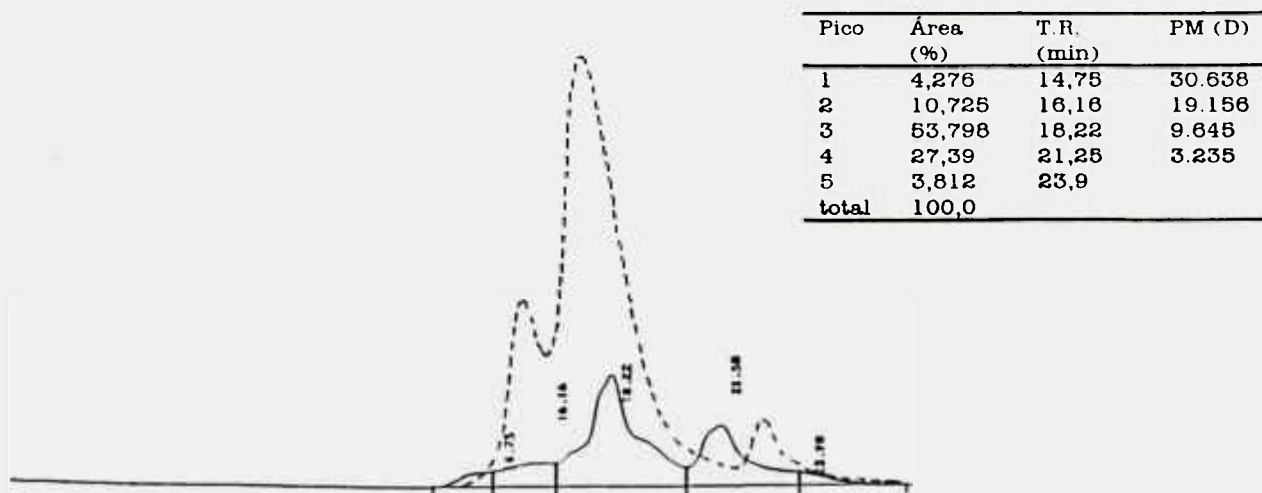


Figura 4j: Cromatografia de crotoxina irradiada com formiato de sódio 0,01M

Coluna: TOSO HAAS TSK 300-SW 600x5 mm
 Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

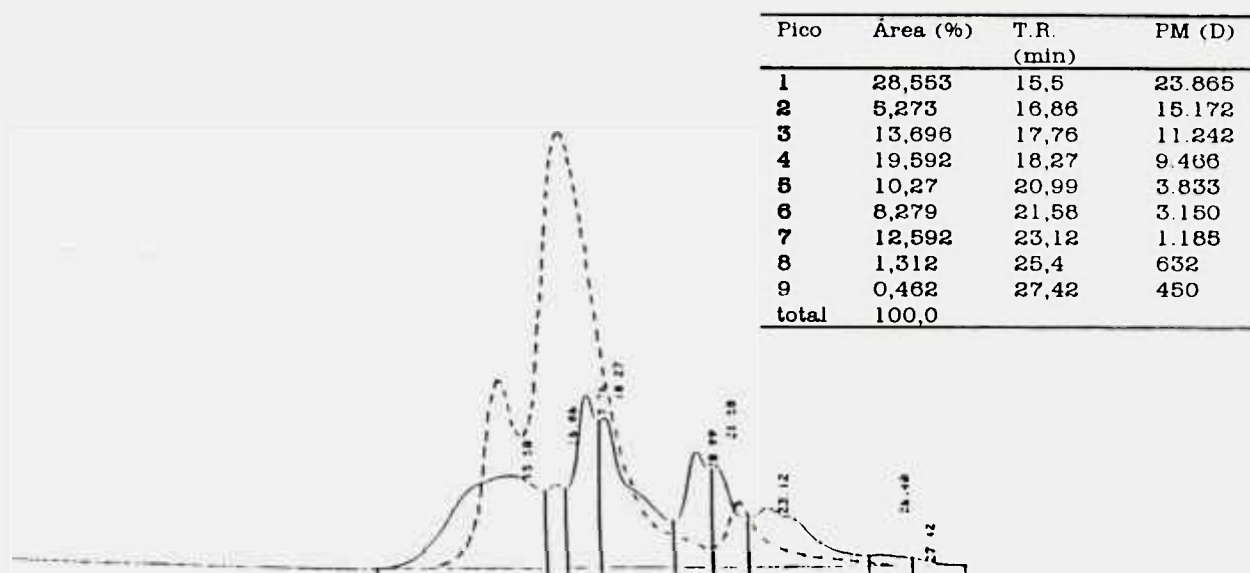


Figura 4k: Cromatografia de crotoxina nativa incubada com DTT 0,05 M (controle)

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm
 Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0
 Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm
 - - - - - crotoxina nativa

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

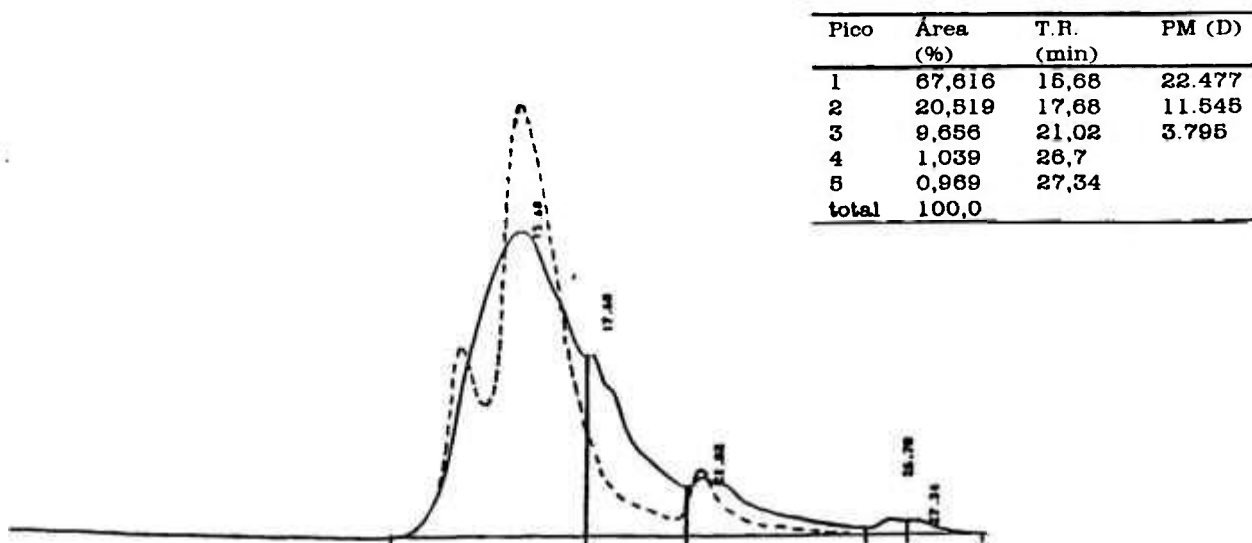


Figura 4l: Cromatografia de crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm

----- crotoxina nativa

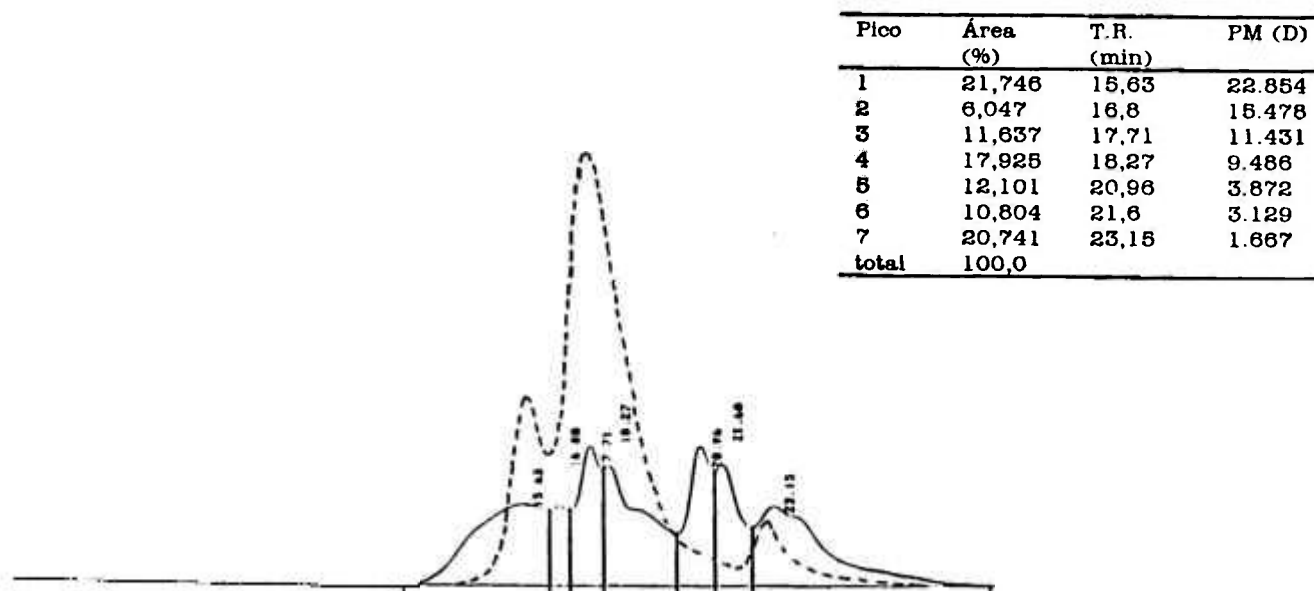


Figura 4m: Cromatografia de crotoxina nativa incubada com cisteína 0,1 M (controle)

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm

----- crotoxina nativa

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

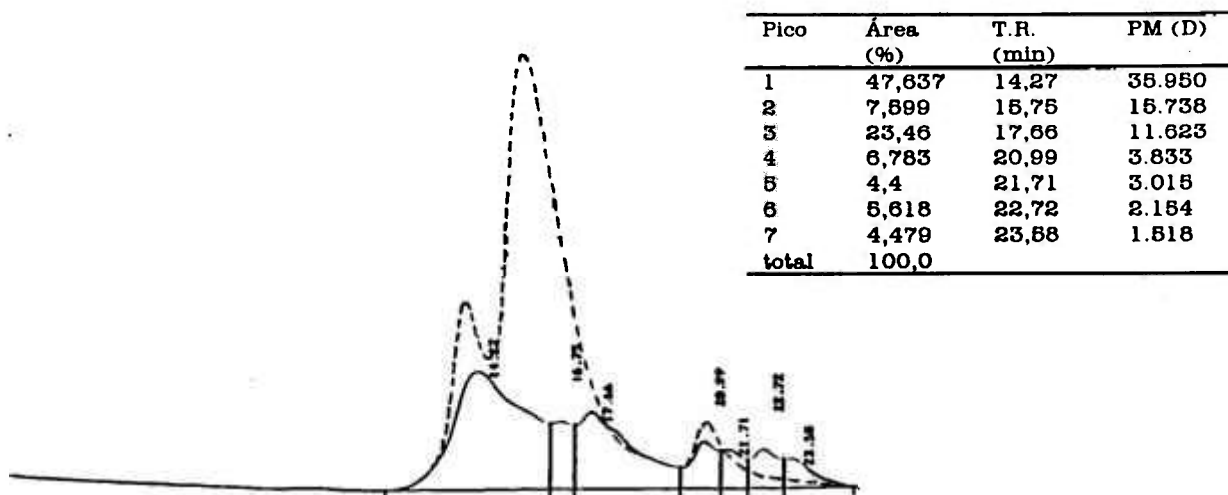


Figura 4n: Cromatografia de crotoxina irradiada com cisteína 0,1M

Coluna: TOSO HAAS TSK 3000-SW 600x5 mm

Fase móvel: bicarbonato de amônio 0,025 M pH 6,0

Fluxo = 1 ml/min $\lambda = 220$ nm

----- crotoxina nativa

6. Atividade tóxica

Os experimentos de DL_{50} (dose capaz de conferir 50% de letalidade na população) foram realizados para a crotoxina nativa e irradiada com ou sem "scavengers". Os dados que possibilitaram os cálculos das DL_{50} e de seus respectivos limites fiduciais pelo método de Spearman-Kärber (WHO, 1981), assim como a toxicidade relativa de cada amostra, estão representados na Tabela VI. Os resultados obtidos (Figura 5) mostram que a crotoxina irradiada sem "scavenger" apresentou-se 3,64 vezes menos tóxica do que a nativa e que as amostras irradiadas com cisteína e DTT não apresentaram nenhuma toxicidade até a dose testada de 2 mg/kg de camundongo. Quando

irradiada com nitrato de sódio e butanol a atividade tóxica da crotoxina se aproximou a do resultado obtido pela irradiação desta proteína sem nenhuma substância. É importante ressaltar que todas as análises com as amostras controle (crotoxina nativa incubada com "scavengers") apresentaram DL_{50} próximas da nativa, exceto a amostra incubada com formiato de sódio. Para esta última, a DL_{50} foi de 0,123 mg/kg, mudando, portanto, o comportamento normal da crotoxina nativa sem atuação da radiação.

Os controles feitos com o inóculo somente dos "scavengers" mostraram 100% de sobrevivência dos animais nas diferentes concentrações testadas.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela VI: Doses inoculadas de Crotoxina (Nativa ou Irrradiada) - percentagem de mortalidade dos animais para determinação da DL₅₀ e Toxicidade Relativa.

AMOSTRA		Dose (mg/Kg)							DL ₅₀	Toxicidade
		Mortalidade (%)							mg/Kg	Relativa
1	dose	0,035	0,046	0,059	0,077	0,1	0,13	0,169	0,072	100,0%
	mort.	0	0	25	50	100	100	100		
2	dose	0,1	0,13	0,18	0,23	0,3	0,38	0,5	0,262	27,5%
	mort.	0	0	0	25	75	100	100		
3	dose	0,12	0,18	0,20	0,26	0,34	0,44	0,58	0,287	25,1%
	mort.	0	25	25	50	75	75	100		
4	dose	0,09	0,12	0,16	0,21	0,27	0,35	0,45	0,268	26,9%
	mort.	0	0	0	25	50	75	100		
5	dose	0,07	0,09	0,12	0,16	0,2	0,27	0,35	0,179	40,2%
	mort.	0	0	0	25	75	100	100		
6	dose	0,041	0,54	0,70	0,91	1,18	1,54	2,0	não	0,0
	mort.	0	0	0	0	0	0	0	alcançada	
7	dose	0,41	0,54	0,70	0,91	1,18	1,54	2,0	não	0,0
	mort.	0	0	0	0	0	0	0	alcançada	
8	dose	0,16	0,21	0,27	0,35	0,45	0,59	0,77	0,372*	19,4%
	mort.	0	0	0	50	75	100	100		

* No controle desta amostra a crotoxina também se apresentou menos tóxica.

1- Crotoxina Nativa; 2- Crotoxina irradiada sem "scavenger"; 3- Crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,1 M; 4- Crotoxina irradiada com butanol 1,5 M; 5- Crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,05 M + butanol 0,5 M; 6- Crotoxina irradiada com DTT 0,05 M; 7- Crotoxina irradiada com cisteína 0,01 M; 8- Crotoxina irradiada com formiato de sódio 0,01 M.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

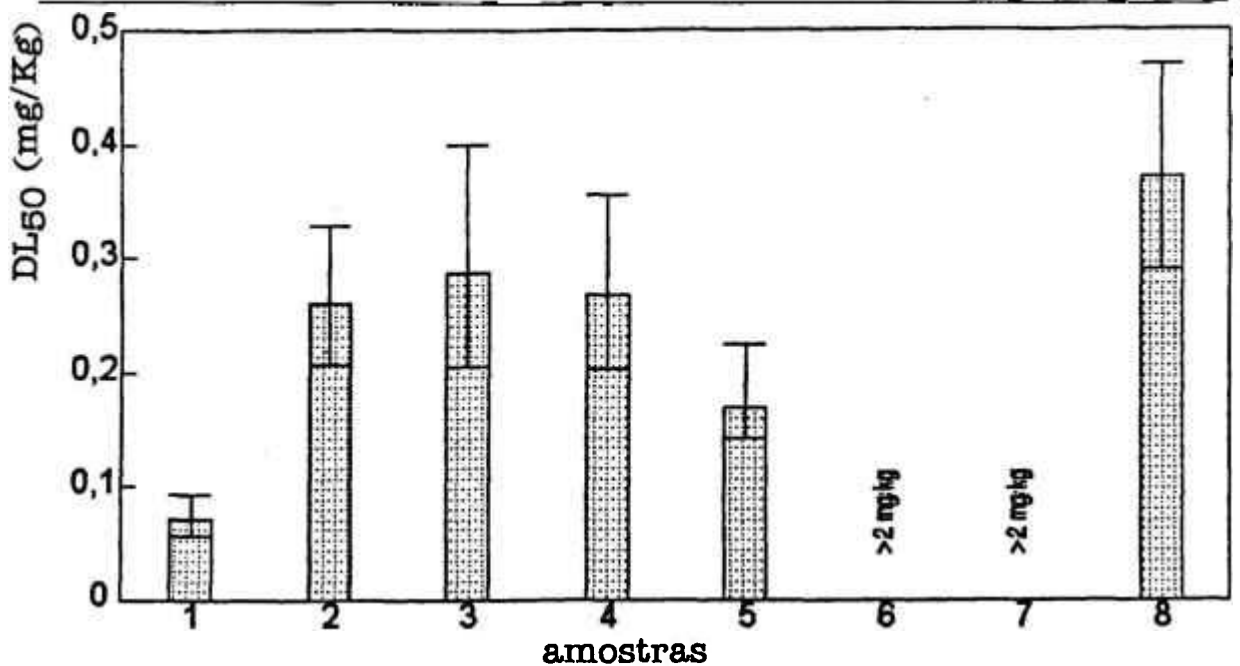


Figura 5: Dose letal 50% das amostras de crotoxina nativa ou irradiadas

1= crotoxina nativa

2= crotoxina irradiada sem "scavenger"

3= crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,01 M

4= crotoxina irradiada com butanol 1,5 M

5= crotoxina irradiada com nitrato de sódio 0,05 M + butanol 0,5 M

6= crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

7= crotoxina irradiada com cisteína 0,01 M

8= crotoxina irradiada com formiato de sódio 0,01 M (o controle também apresentou decréscimo na toxicidade)

7. Atividade enzimática

A curva padrão de atividade hemolítica indireta feita utilizando-se fosfolipase A_2 de *C. d. terrificus* (SIGMA) está representada na Figura 6.

Os resultados do teste de atividade fosfolipásica da crotoxina (Tabela VII) mostram que a amostra irradiada sem "scavengers" apresentou atividade enzimática reduzida de 31,25% em relação à nativa. As amostras irradiadas com as diferentes concentrações de

nitrito de sódio sofreram a mesma alteração que a crotoxina irradiada sem nenhuma substância. Já a crotoxina irradiada com butanol em diferentes concentrações e a irradiada com butanol + nitrito de sódio não apresentaram perda de atividade em relação a nativa. Pode-se notar que as perdas de atividade enzimática que ocorreram com as amostras de crotoxina irradiada com DTT, cisteína e formiato de sódio também foram observadas em suas amostras controle. Entretanto para o DTT, mesmo ocorrendo perda de atividade no controle a amostra irradiada manteve o padrão de atividade da crotoxina irradiada sem substâncias, indicando sua capacidade de atuação como "scavenger".

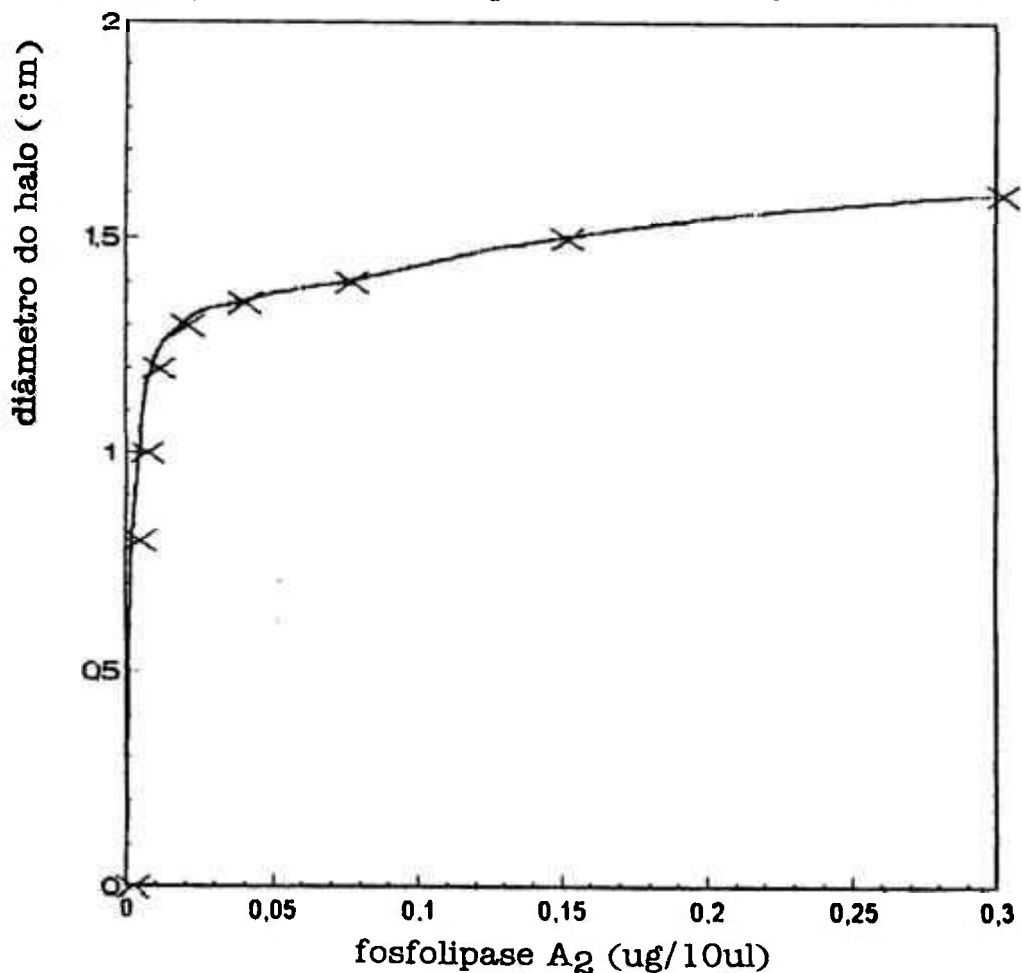


Figura 6: Curva padrão de atividade hemolítica indireta de fosfolipase A₂ de *C. d. terrificus*

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela VII: Atividade enzimática da crotoxina nativa ou irradiada

Amostras	Diâmetro do halo de hemólise (cm)	Atividade total (%)	Perda de atividade(%)
salina	0,0	-	-
cx nativa	1,6	100,0	0,0
cx nat + butanol	1,6	100,0	0,0
cx nat + n. sódio	1,6	100,0	0,0
cx nat + but 0,5M + ns 0,05M	1,6	100,0	0,0
cx nat + cisteína 0,1 M	1,2	75,0	25,0
cx nat + cisteína 0,01 M	1,2	75,0	25,0
cx nat + DTT 0,05 M	0,9	56,25	43,75
cx nat + DTT 0,005 M	0,9	56,25	43,75
cx nat + form. sódio 0,01M	0,8	50,0	50,0
cx irr s/ "scavengers"	1,1	68,75	31,25
cx irr c/ butanol	1,6	100,0	0,0
cx irr c/ n. sódio	1,1	68,75	31,25
cx irr c/ but 0,5M + ns0,05M	1,6	100,0	0,0
cx irr c/ cisteína 0,1 M	1,2	75,0	25,0
cx irr c/ cisteína 0,01 M	1,2	75,0	25,0
cx irr c/ DTT 0,05 M	1,1	68,75	31,25
cx irr c/ DTT 0,005 M	1,1	68,75	31,25
cx irr c/ form. sódio 0,01 M	0,8	50,0	50,0

8. Capacidade imunogênica

Com intuito de se observar as diferenças entre os soros produzidos contra as amostras de crotoxina nativa ou irradiada na presença ou ausência de "scavengers", animais foram imunizados seguindo item 5.3.1. A Figura 6 mostra que, para todos os anti-soros produzidos, os títulos foram próximos de 1:60.

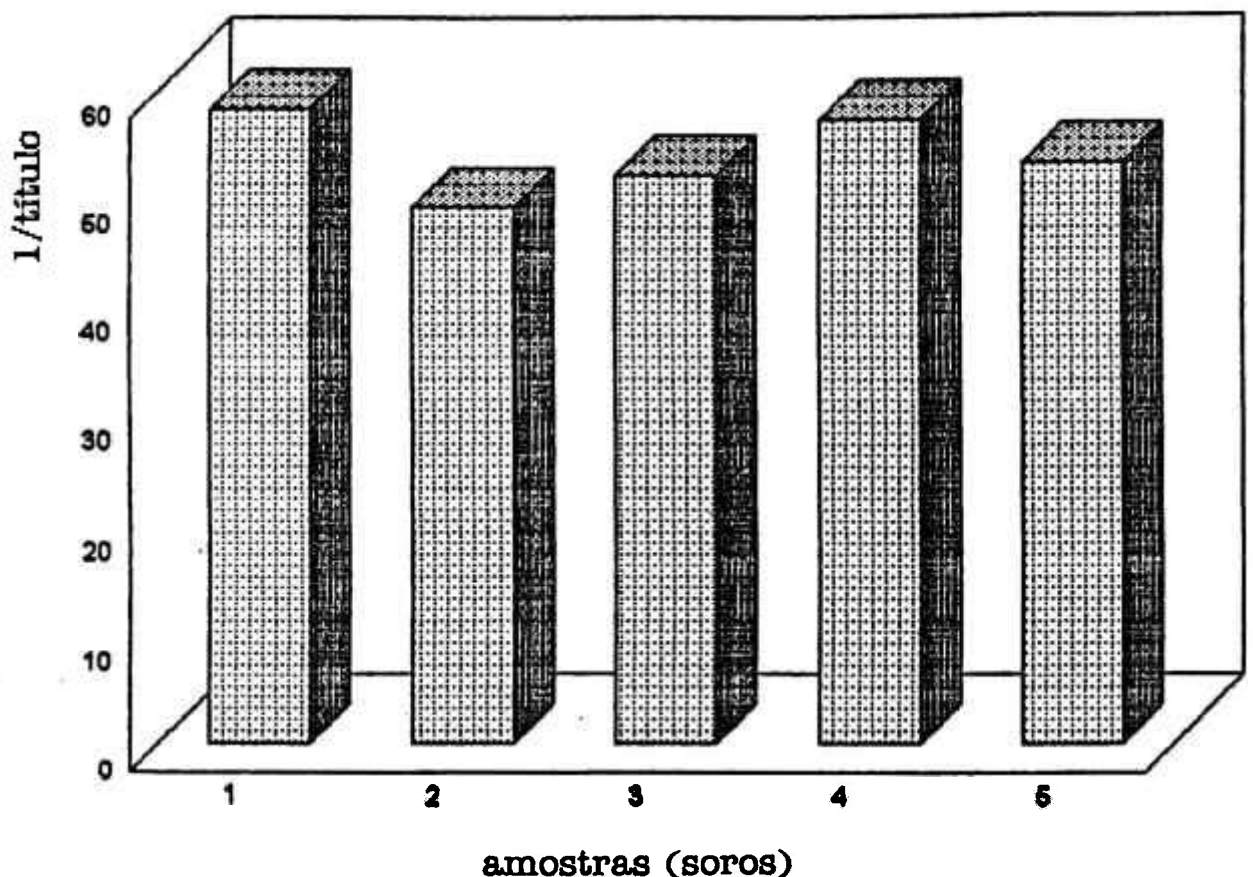


Figura 7: Detecção de anticorpos produzidos contra crotoxina (nativa ou irradiada) 30 dias após o inóculo em camundongos. sensibilizante das placas: veneno total de *C. d. terrificus*
1= anti-crotoxina nativa; 2= anti-crotoxina irradiada; 3= anti-crotoxina irradiada c/ butanol+ nitrato de sódio; 4= anti-crotoxina irradiada c/ DTT; 5= anti-crotoxina irradiada c/ cisteína

9. Capacidade neutralizante

9.1. Soroneutralização "in vivo"

O teste da capacidade de cada anti-soro produzido em neutralizar "in vivo" a ação tóxica da crotoxina é mostrado na Tabela VIII. Podemos notar que até o desafio com 6 DL₅₀ todos os grupos mostraram sobreviventes, sendo em proporção maior dos anti-crotoxina irradiada (com ou sem "scavengers") em relação à nativa. Acima da dose citada somente sobreviveram os camundongos inoculados com crotoxina irradiada com cisteína ou DTT, sendo esta última amostra produtora de anti-soro capaz de manter sobreviventes desafiados com até 12 DL₅₀.

9.2. Soroneutralização "in vitro"

A tabela IX indica a percentagem de proteção observada em camundongos inoculados com os anti-soros produzidos que foram incubados com a crotoxina nativa, conforme descrito em Materiais e Métodos. O anti-soro produzido contra crotoxina irradiada com cisteína mostrou poder de neutralizar até 8,3 DL₅₀ (0,6 mg/kg) de crotoxina nativa. O anti-soro produzido contra crotoxina irradiada com DTT também mostrou ser eficiente. As amostras de crotoxina irradiada sem "scavengers" e irradiada com butanol + nitrato de sódio mostraram o mesmo comportamento, conferindo o dobro de proteção em relação ao

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

soro anti-crotoxina nativa que neutralizou seu próprio antígeno até 2,5 vezes sua DL_{50} (0,18 mg/kg) para 25% dos animais.

Tabela VIII: Percentagem de sobrevivência de camundongos imunizados com crotoxina (nativa ou irradiada) e desafiados com crotoxina nativa

Desafio (crotoxina nativa)	% de sobrevivência				
	1	2	3	4	5
3 DL_{50}	16,6	25,0	31,25	33,0	25,0
6 DL_{50}	8,3	12,5	25	16,6	12,5
9 DL_{50}	0,0	0,0	8,3	16,6	0,0
12 DL_{50}	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0

1 - Imunização com crotoxina nativa

2 - Imunização com crotoxina irradiada sem "scavengers"

3 - Imunização com crotoxina irradiada com cisteína 0,01 M

4 - Imunização com crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

5 - Imunização com crotoxina irradiada com butanol 0,5 M + nitrato de sódio 0,05 M

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

Tabela IX: Percentagem de proteção de camundongos inoculados com crotoxina nativa incubada com os anti-soros produzidos em camundongos

Crotoxina nativa (mg/kg)	% sobrevivência				
	1	2	3	4	5
0,6	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
0,3	0,0	0,0	75,0	25,0	0,0
0,18	25,0	50,0	75,0	25,0	50,0
0,10	50,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,06	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

1 - anti-crotoxina nativa

2 - anti-crotoxina irradiada sem "scavengers"

3 - anti-crotoxina irradiada com cisteína 0,01 M

4 - anti-crotoxina irradiada com DTT 0,05 M

5 - anti-crotoxina irradiada com butanol 0,5 M + nitrato de sódio 0,05 M

10. Resumo dos resultados

A tabela X resume os principais resultados obtidos nos experimentos das atividades biológicas, imunológicas e de análise estrutural das amostras estudadas.

Tabela X: Resumo dos resultados

Amostra de crotoxina	DL ₅₀ (mg/Kg)	Atividade enzimática(%)	Neutralização "in vivo" *	Neutralização "in vitro" **	Estrutura (HPLC)
Nativa	0,072	100,0	6 DL ₅₀	2,5 DL ₅₀	não alterada
Irr.s/" scavenger	0,262	68,75	6 DL ₅₀	2,5 DL ₅₀	alterada
Irr. c/ nit. sódio	0,287	68,75	-	-	não alterada
Irr. c/ butanol	0,268	100,0	-	-	alterada
Irr. c/ but + ns	0,179	100,0	6 DL ₅₀	2,5 DL ₅₀	não alterada
Irr. c/ DTT	não alcançada	68,75	12 DL ₅₀	4,2 DL ₅₀	alterada
Irr. c/ cisteína	não alcançada	75,0	9 DL ₅₀	8,3 DL ₅₀	alterada
Irr. c/ form. sódio	0,372	50,0	-	-	alterada

* = Dose máxima de desafio para qual ainda foram observados sobreviventes

** = Proteção máxima alcançada pelos anti-soros, obtidos a partir das amostras relacionadas na 1ª coluna, incubados com crotoxina nativa

V- DISCUSSÃO

A crotoxina utilizada nos experimentos foi parcialmente purificada usando-se cromatografia de exclusão molecular a partir do veneno total de *C. d. terrificus*. A boa separação obtida pelo método confirmam os resultados obtidos por Takeda *et al.* (1985), Souza-Filho (1988) e Nascimento (1991). A separação utilizando-se o gel Sephadex G-75 R foi tão eficiente quanto aquela onde foi utilizada a resina Sephacryl S-200 HR, com a vantagem desta última poder ser concluída em menor tempo. A diminuição do tempo de corrida pelo aumento do fluxo foi permitido por ser a resina mais resistente do que o gel, o que otimizou o método.

A precipitação da crotoxina no seu ponto isoeletrico (pH 4,7), mostrou ser um importante passo para a purificação desta proteína como pode ser observado pela ausência de linhas de contaminação na imunoeletroforese e eletroforese (EGPA-SDS não reduzida). A toxina assim tratada comportou-se como uma proteína pura conforme Souza-Filho (1988) e Nascimento (1991) já haviam observado em seus trabalhos.

A irradiação na dose de 2000 Gy da fração purificada na ausência ou presença de "scavengers" não levou à formação de precipitados evidentes, diferindo de alguns estudos anteriores (Baride *et al.*, 1980; Souza-Filho, 1988) e corroborando os resultados de Nascimento (1991) que obteve esse efeito acidificando as amostras com salina pH 3,0 antes da irradiação.

As concentrações de "scavengers" irradiadas juntamente com a crotoxina, foram teoricamente suficientes para superar a relação de competição 1:1 entre as substâncias utilizadas e os rendimentos (G) calculados para as principais espécies reativas formadas durante a radiólise da água, nas condições de irradiação estabelecidas (Tabela V). Estando no meio um "scavenger" específico, em concentração suficiente, podemos sugerir que a espécie pela qual este compete não interferiu nas possíveis modificações ocorridas na toxina presente no mesmo meio. Portanto, estas modificações poderiam estar sendo provocadas pelas outras espécies reativas, livres de competição. Desta forma foram possíveis melhores esclarecimentos em relação ao mecanismo de ação dos produtos da radiação sobre a proteína em estudo a partir dos resultados obtidos.

Considerando os aspectos bioquímicos, algumas modificações foram observadas nas amostras de crotoxina irradiada com ou sem "scavengers" em relação à nativa.

A análise imunoeletroforética mostrou que a radiação em si não interferiu na capacidade antigênica da crotoxina, corroborando os dados de Nascimento (1991). Por outro lado, o uso de DTT junto à toxina parece provocar redução da resposta antigênica e possível desestruturação da crotoxina, mostrando banda de menor tamanho e intensidade em relação às outras amostras; enquanto a crotoxina irradiada com formiato de sódio pareceu perder totalmente a capacidade antigênica não apresentando linhas de precipitação no ensaio imunoeletroforético. Exceção feita à última amostra citada, as amostras não apresentaram mobilidade em função da carga,

permanecendo as bandas próximas ao orifício de aplicação. No início do trabalho, todas as amostras foram submetidas ao método de Imunodifusão Dupla-Radial de Ouchterlony (1958), usando como anticorpo o soro anti-crotálico comercial e soro anti-crotoxina nativa produzido em coelhos. Este método foi posteriormente substituído pela imunoeletroforese que, além de confirmar os resultados obtidos, mostrou ser um método mais sensível e apresentou a vantagem de diferenciar as amostras quanto às possíveis mudanças de cargas elétricas.

Pesquisas envolvendo a destoxicação de venenos (Ananthanarayanan & Bigelow, 1969; Sundaram *et al.*, 1970; Baride *et al.*, 1980; Murata, 1988; Souza-Filho, 1988; Guarnieri-Cruz *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1990; Nascimento, 1991; Guarnieri, 1992) e outras proteínas (Nayar & Spinivasam, 1975; Chanderkar *et al.*, 1976), afirmam que, devido a ação da radiação, ocorre um aumento do coeficiente de extinção molar, que pode ser decorrente do desdobramento da molécula com exposição de seus grupos cromóforos (Cantor & Schimmel, 1980). Considerando estes dados, foram feitas leituras das amostras de crotoxina nativa e irradiada com ou sem "scavengers" em espectro de absorção na região ultravioleta, entre 215 e 350 nm. Foi observado um aumento do coeficiente de extinção molar nas amostras irradiadas, mas a imprecisão dos resultados inter-ensaios levou ao abandono do método para avaliação das alterações estruturais.

Resultados relevantes foram obtidos durante a análise das amostras em Cromatografia de Alta Pressão (HPLC) considerando os aspectos estruturais da crotoxina frente aos "scavengers" utilizados e

as possíveis atuações das principais espécies reativas formadas na solução durante a irradiação.

A irradiação pareceu provocar na crotoxina a formação de substâncias de maior peso molecular observados com o aumento da área do primeiro pico; bem como um desdobramento ou quebra da molécula sugerido pelo alargamento do pico principal. Mudanças estruturais ocorridas na molécula durante a irradiação já eram esperadas devido às reações das principais espécies reativas que provocam ligações e alterações inter e intramoleculares nas proteínas, resultando frequentemente em desnaturação total ou alterações da estrutura terciária ou secundária da proteína (Adams *et al.*, 1972; Bisby *et al.*, 1974; Chanderkar *et al.*, 1976; Butler *et al.*, 1987; Garrison, 1987; Guarnieri-Cruz *et al.*, 1990). É também importante considerar as lesões primárias produzidas pela absorção de energia da radiação (Farragi *et al.*, 1978; Daniel *et al.*, 1987).

O uso de butanol como "scavenger" de OH^\bullet não protegeu a estrutura da molécula durante a irradiação que apresentou o mesmo tipo de perfil cromatográfico e mesmo padrão eletroforético da crotoxina irradiada sem "scavengers" (Tabela X). Este resultado pode mostrar que o radical OH^\bullet , teoricamente ausente neste caso, não é o principal causador de danos estruturais da crotoxina durante a irradiação, diferindo de outras proteínas (Adams *et al.*, 1972; Adams & Posener, 1979; Chanderkar *et al.*, 1976; Greenstock, 1984; Garrison, 1987).

Quando irradiada com nitrato de sódio, "scavenger" de e^-_{aq} , a estrutura da proteína pareceu ser protegida, apresentando perfil

cromatográfico bem próximo ao da nativa (Tabela X). Este resultado sugere que o e^{-aq} atua sobre a proteína durante a irradiação causando à mesma prováveis quebras e desdobramentos, assim como a formação de agregados, já que na sua ausência a estrutura da toxina permaneceu íntegra. O mesmo resultado foi obtido quando butanol + nitrato de sódio estiveram juntos à crotoxina durante a irradiação e, tendo em vista as observações feitas anteriormente, a estrutura pode ter sido protegida pela ausência de elétron aquoso. A análise eletroforética corroborou estes resultados não mostrando evidências de formações protéicas de alto peso molecular nas amostras em questão.

A crotoxina irradiada ou não na presença de formiato de sódio, usado como "scavenger" de e^{-aq} e OH^{\bullet} , sofreu aparentes desdobramentos ou quebras da molécula e, contrariamente ao esperado, esta substância pareceu sensibilizar e não proteger a estrutura da proteína da ação da radiação ionizante.

A simples incubação das amostras com DL-Ditiotreitol (DTT) e cisteína, "scavengers" de OH^{\bullet} , promoveram desmembramento da proteína que permaneceu incubada com estas substâncias durante o tempo de irradiação (amostras controle) apresentando picos cromatográficos não observados no perfil da crotoxina nativa, devido, talvez, as quebras das pontes de sulfeto (S-S) inter e intra cadeias da crotoxina, o que mostra a importância do grupo sulfidril na manutenção da integridade da molécula. Silva *et al.* (1994) também mostraram que ocorre mudança conformacional na estrutura do veneno de *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) incubado com DTT, observada por uma diminuição de até 94% da atividade de liberação de acetilcolina

(Ach) "in vitro". Os autores também sugerem que o mecanismo responsável pelos resultados seja a quebra das pontes de sulfeto pelo grupo tiol.

As amostras incubadas com DTT e cisteína que foram submetidas à irradiação não sofreram o mesmo desdobramento acentuado das amostras controle, principalmente no caso do DTT que apresentou perfil semelhante ao da crotoxina irradiada sem "scavengers" e análise eletroforética com padrão de banda semelhante à nativa. Estes resultados sugeriram que pode ter ocorrido, durante a irradiação, rearranjos dos produtos em solução via sulfidril livre, reação esta, proposta por Butler *et al.* (1984): $RS \xrightarrow{\text{irradiação}} RS^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + \bullet SR \rightarrow RSSR$.

A crotoxina, quando irradiada sem "scavengers", perdeu 3,64 vezes sua atividade tóxica em relação à nativa. Esta destoxicação da toxina corrobora os resultados obtidos por Baride *et al.*, (1980) com irradiação de neurotoxina e cardiotoxina de veneno de *Naja naja* e os de Murata (1988) e Nascimento (1991) com irradiação de veneno total de *C. d. terrificus* e crotoxina isolada, respectivamente. Pôde-se observar que a crotoxina irradiada perde 31,25% de sua atividade enzimática total e mantém as atividades antigênica e imunogênica intactas.

Com o uso de butanol, "scavenger" de radical hidroxila (OH^{\bullet}), e nitrato de sódio, "scavenger" de eletron aquoso (e^{-aq}), houve manutenção da antigenicidade das amostras e a atividade tóxica da crotoxina mostrou ser bem próxima à da irradiada sem "scavengers" (Tabela X). Portanto, podemos sugerir que o sítio tóxico pode estar sendo atingido por outras espécies reativas da radiólise da água e não

pelo elétron aquoso ou pelo radical hidroxila, já que houve destoxicação da crotoxina tanto na presença como na ausência destas espécies estudadas.

No que se refere a atividade enzimática, a crotoxina manteve 100% de atividade quando irradiada com butanol enquanto que, na presença de nitrato de sódio, houve perda de 31,25% de atividade como na amostra irradiada sem "scavengers". A atividade permaneceu inalterada na presença das duas substâncias no mesmo meio (Tabela X). Os resultados sugerem que o radical hidroxila pode ser o responsável pela alteração ocorrida no sítio enzimático da proteína durante a irradiação. As amostras controle para os experimentos de atividade tóxica e enzimática utilizando-se butanol e/ou nitrato de sódio, não mostraram alteração em relação à nativa. Entre as citadas, a mistura de butanol + nitrato de sódio foi utilizada para os ensaios de imunogenicidade resultando em formação de anticorpos com a mesma capacidade neutralizante que a obtida para anticorpos anti-crotoxina nativa e irradiada sem "scavengers".

Para todas as amostras foram produzidos anti-soros com mesmo título obtido contra a crotoxina nativa. É importante ressaltar que embora o título de anticorpos produzidos pareça ser baixo (1:60), o resultado é bom considerando-se o critério de imunização utilizado.

Com uso de cisteína e DTT a crotoxina se tornou praticamente atóxica, não sendo alcançada a DL_{50} até a dose testada de 2 mg/kg de camundongo, o que corresponde a 27,8 vezes a DL_{50} da amostra nativa e 7,6 vezes a da irradiada. Houve perda da atividade enzimática total, tanto nas amostras controle como nas irradiadas; entretanto, a

amostra irradiada com DTT, manteve a mesma percentagem de perda da crotoxina irradiada sem nenhuma substância (Tabela X). A perda de atividade em sistemas biológicos provocada pela radiação gama também tem sido observada utilizando-se substâncias do grupo tiol como "scavengers" das espécies reativas do oxigênio. Kuo *et al.* (1993) estudaram a hipótese de que as antecipações dos eventos celulares normais durante a radiação gama, ocorriam pela ativação do canal de potássio provocada pelas espécies reativas do oxigênio formadas durante o processo. Utilizando-se N-acetil-L-cisteína (NAC) como "scavenger" destas espécies, puderam comprovar a hipótese quando a ativação do canal de potássio foi totalmente abolida nas células pré-tratadas com esta substância (NAC).

Os testes de desafio aos animais que foram inoculados com a crotoxina irradiada na presença de cisteína e DTT mostrou um número de sobreviventes 1,5 vezes maior para a amostra contendo cisteína e 2 vezes maior para a amostra contendo DTT em relação à nativa. Os anticorpos produzidos contra crotoxina irradiada com cisteína e contra crotoxina irradiada com DTT, quando incubados com a crotoxina nativa, conferiram proteção aos animais de 8,3 e 4,2 DL₅₀ da crotoxina nativa, respectivamente, sendo que para as outras amostras a proteção foi de, no máximo, 2,5 DL₅₀. Para os testes de neutralização "in vivo", o anticorpo mais eficiente foi o anti-crotoxina irradiada com DTT que manteve sobreviventes até o desafio testado de 12 DL₅₀ da crotoxina nativa (Tabela X).

VI- CONCLUSÕES

1. A cromatografia de exclusão molecular seguida pela precipitação no ponto isoelétrico foram suficientes para isolar e purificar a crotoxina, conforme pode ser verificado nas análises eletro e imunoeletroforéticas.

2. A irradiação da crotoxina na ausência de substâncias sequestradoras ("scavengers") de radicais livres, modificou a estrutura da proteína provocando a formação de substâncias de alto peso molecular e possíveis quebras ou desdobramentos da molécula.

3. O uso de álcool butílico terciário (butanol), "scavenger" de radical hidroxila, não protegeu estruturalmente a molécula protéica durante a irradiação; já o nitrato de sódio, "scavenger" de elétron aquoso, pareceu proteger a estrutura, tendo a proteína se comportando como a nativa.

4. DL-Ditiotreitol (DTT) e cisteína (cis), "scavengers" de radical hidroxila, pareceram promover rearranjos na estrutura da proteína durante a irradiação.

5. Formiato de sódio não mostrou ser "scavenger" adequado no estudo elucidativo da ação da radiação sobre a crotoxina, provocando notória desestruturação das amostras incubadas e/ou irradiadas na presença desta substância.

6. A espécie reativa elétron aquoso não alterou a atividade enzimática da crotoxina, entretanto causou modificações estruturais na proteína irradiada. Por outro lado, o radical hidroxila alterou a

atividade enzimática, mas não causou modificações estruturais durante a irradiação.

7. Os resultados mostraram que tanto a espécie reativa elétron aquoso quanto o radical hidroxila não participaram do processo de destoxicação da crotoxina durante a irradiação.

8. Todas as amostras mantiveram a capacidade imunogênica induzindo a formação de anticorpos com títulos próximos aos obtidos com a crotoxina nativa.

9. As capacidades neutralizantes dos anti-soros produzidos contra as amostras de crotoxina irradiadas foram sempre maiores do que o anti-crotoxina nativa. As neutralizações mais eficientes ocorreram para os anti-crotoxina irradiada com cisteína e DTT, onde houveram sobreviventes até os desafios de 9 e 12 DL₅₀ de crotoxina nativa, respectivamente.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.E.; ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON, R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions of inorganic radical anions with amino acids. **Radiat. Res.**, 49: 278-289, 1972 a.

ADAMS, G.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON, R.L. Selective free radicals reations with proteins and enzymes: the inactivation of ribonuclease. **Radiat. Res.** , 49: 290-299, 1972 b.

ADAMS, G.E. & POSENER, M.L. Free radical reaction with proteins and enzymes: the inactivation of pepsin. **Int. J. Radiat. Biol.**, 35(6): 497-507, 1979.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V. & KRUGGEL, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Archs of Biochem. Biophys**, 249: 296-300, 1986.

AIRD, S.D.; YATES, J. R. I.; MARTINO, P. A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; KAISER, I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochem. Biophys. Acta**, 1040(2): 217-224, 1990.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J.

Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, 26: 953-960, 1988.

AMARAL, A. **Serpentes do Brasil. Iconografia colorida**. São Paulo Melhoramentos, 1977.

AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOYOUUMDJIAN, L.A.; CARDOSO, J.C.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M. & LOPES, P.F.A. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 53 pp, 1987.

ANANTHANARAYANAN, V.S. & BIGELOW, C.C. Unusual difference spectra of proteins containing Tryptophan. II- Studies with proteins. **Biochem.**, 8: 3723-3728, 1969.

AUNG-KHIN, M.; LWIN-OHN, K. & ZIN, T. Immunogenicity of the toxoid of Russell's viper venoms. **The Snake**, 12: 45-53, 1980.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, 23: 631-636, 1985.

BARIDE, R.M.; JAIN, S.D. & GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. **Indian J. Med. Res.**, 72: 571-6, 1980.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. EPUC: Ed. de Publicações Científicas - Rio de Janeiro, 411 p., 1994.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Latino-Am.**, 11: 224-232, 1961.

BASU-MODAK, S. & TYRRELL, R. M. Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. **Cancer Res.**, 53(19): 4505-4510, 1993.

BICALHO, R.X.; ROCHA, O.A.; HENEINE, L.G.D.; MAGALHÃES, A. & HENEINE, I.F. The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, 28(2): 171-179, 1990.

BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; ADAMS, G.E. & REDPATH, J.L. Selective free radicals reactions with proteins and enzymes: the inactivation of subtilisin Calberg and subtilisin Novo. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, 70: 2210-2218, 1974.

BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol-Toxin reviews**, 7(2): 121-209, 1988/1989.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H.
Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, 99: 471, 1979.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for a quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

BREITHAUPT, H.; RÜBSAMEN, K. & HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex biochemical analysis of crotoxin and the basic *Crotalus* phospholipase A. **Eur. J. Biochem.**, 49: 333, 1974.

BUTLER, J.; HOEY, B.M. & SWALLOW, A.J. Radiation Chemistry. **Annual Rep. Prog. Chem.**, 83: 129-175, 1987.

BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological system. **Rad. Phys. Chem.**, 24: 273-282, 1984.

CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca: Cornell University Press, 425 pp., 1989.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R. **Biophysical Chemistry**. Part II:

Techniques for the study of biological structure and function. New York, Academic press, 958 pp., 1980.

CARDI, B. A.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J. R.; ANDRADE-JUNIOR, H.

F. Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in the motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 25(9): 905-908, 1992.

CARDOSO, J.L.L. & BRANDO, R.V. **Acidentes por animais peçonhentos:**

clínica e tratamento. São Paulo, Editora Santos, 1982.

CHANDERKAR, L.P.; GURNANI, S. & NADKARNI, G.B. The involvement of aromatic amino acids in biological activities of bovine fibrinogen as assessed by gamma irradiation. **Radiat. Res.**, 65(2): 283-291, 1976.

CHANG, C.C. & LEE, J.D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like beta-Bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 296: 159, 1977.

CHATTERJEE, A. & RAMAN, M. J. Protective effect of cysteine against x-ray and bleomycin induced chromosomal aberrations and cell cycle delay. **Mutat. Res.**, 290(2): 231-238, 1993.

CHEYMOL, J.; MOURA-GONÇALVES, J.; BOURILLET, F.; ROCHA-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. I. sur préparations neuromusculaires "in situ". **Toxicon**, 9: 279-286, 1971 a.

CHEYMOL, J.; MOURA-GONÇALVES, J.; BOURILLET, F.; ROCHA-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. II. sur préparations isolées. **Toxicon**, 9: 287-289, 1971 b.

CHIOU, S. H.; HUNG, C. C.; HUANG, K. F. Characterization of a protease with alpha-and-beta-fibrinogenase activity from the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 187(1): 389-396, 1992.

CHIUNG-CHANG, C. & HONG-TSENG, K. Effect of crotamine a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 63: 551-559, 1978.

COSTA, L.M.; TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; BERRA, J.A.P.; ADELINO, M.G.E.; SOERENSEN, B.; PINTO, J.R. & VANCETTO, M.D.C. Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* "in natura", tratados com formaldeído e submetido à ação térmica. **Vac. Soros**, 1: 24-29, 1985.

COSTA, T.A. **Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo, 1988.

CZAPSKI, G. On the use of OH scavengers in biological systems. **Israel J. Chem.**, 24: 29-32, 1984.

CZAPSKI, G. & ILAN, Y. On the generation of the hydroxilation agent from superoxide radical can the Harber-Weiss reaction be the source of H·radicals? **Photochemistry and Photobiology**, 28: 651-653, 1978.

DANIEL, J.P.; HENEINE, L.G.D.; TAVARES, C.P.A.; NASCIMENTO, N.C.S.; HENEINE, I.F. Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20: 713-720, 1987.

DETINGER, H. & JUNG, H. The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. In: DERTINGER, H. & JUNG, H., eds. **Molecular Radiation Biology**. Berlin, Springer -Verlag, Ch.9, p. 115-133, 1970.

DRAGANIC, I.G. & DRAGANIC, Z.D. **The radiation chemistry of water**. New York, Academic, 1971.

FARRAGI, N.; KLAPPER, M.H. & DORFMAN, L.M. Fast reaction kinetics of one- electron transfer in proteins. The histidyl radical. Mode of electron migration. **J. Phys. Chem.**, 82 (5): 508-512, 1978.

FLOWERS, H.H. Effects of x-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* (Cottonmouth mocassin) venom. **Toxicon**, 3: 302-304, 1966.

FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archs. Biochem.**, 60: 64-73, 1956.

FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T.W. & HSIANG, M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: Natural toxins, p. 561 (EAKER, D. & WADSTROM, Eds.) Pergamon, Oxford, 1980.

GARRISON, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. **Chem. Rev.**, 87: 381-398, 1987.

GIROUX, E. & LACHMANN, P.J. "In vivo" diminution by chelators of snake venom provoked hemorrhage and "in vitro" inhibition of proteolytic activity. **Toxicon**, 19(4): 481-492, 1981.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J. & ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, 22: 85, 1984.

GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, 22: 791, 1984.

GORDON, S.; HART, E.J.; MATHESON, M.S.; RABANI, J. & THOMAS, J.K. Reaction constants of the hydrated electron. **J. Am. Chem. Soc.**, 85: 1375-1377, 1963.

GOUCHER, C.R. & FLOWERS, H.H. The chemical modification of necrogenic and proteolytic activities of venom and the use of EDTA to produce *Agkistrodon piscivorus*, a venom toxoid. **Toxicon**, 2: 139-145, 1964.

GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A.JR. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimique d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. **Biochim. Biophys. Acta**, 10: 193-194, 1953.

GREENSTOCK, C.L. Oxy-radicals and the radiobiological oxygen effect. **Israel J. Chem.**, 24(1): 1-10, 1984.

GROSCH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E. **Biological effects of radiation.** 2nd ed. New York, Academic Press, 1979.

GUARNIERI, M.C. **Estudo dos efeitos da radiação gama de Co⁶⁰ nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*.** (Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo, 1992.

GUARNIERI-CRUZ, M.C.; MURATA, Y.; SOUZA-FILHO, J.N.; NASCIMENTO, N. & ROGERO, J.R. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. In: International Society on Toxinology Pan American Section- III Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins. Mexico, 9-12 January 1990-Mexico 1990, p. 93.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E. & CERDAS, L. An alternative "in vitro" method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, 26: 411-413, 1988.

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. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálicos tratados por glutaraldeído. **Mem. Inst. Butantan**, 51(3): 85-90, 1989.

HABERMANN, E. & BREITHAUPT, H. Mini-review the crotoxin complex-
an example of biochemical and pharmacological protein
complementation. **Toxicon**, 16: 19-30, 1978.

HABERMANN, E. & RÜBSAMEN, K. Biochemical and pharmacological
analysis of so-called crotoxin. In: Toxins of Animal and Plant Origin,
Proc. of the 2nd International Symposium on Animal and Plant
Toxins, Tel Aviv, 1970, v.1 p. 333.

HANASHIRO, M.A.; DA SILVA, M.H. & BIER, O.G. Neutralization of
crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus*
phospholipase A₂. **Immunochemistry**, 15: 745, 1978.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies**. A Laboratory Manual Ed. Cold.
Spring Harbor Lab., New York, 1988.

HART, E.J. & ANBAR, M. **The hydrated electron**. New York, Wiley-
Interscience, 1970.

HATI, A.K.; HATI, R.N.; MANDAL, M.; PANDA, D. & DAS, S. The effect
of gamma irradiated detoxified viper venom as a toxoid against
viper venom. **The Snake**, 21: 36-40, 1989.

HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two
components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 68:1560-1567,
1971.

HENDON, R.A. & TU, A.T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake. Neurotoxic action. **Biochem. Biophys. Acta**, 578: 243-252, 1979.

HENEINE, L.G.D.; CARDOSO, V.N.; DANIEL, J.P. & HENEIDE, I.F. Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello 1922) venom by iodination and some immunogenic proprieties of the derivatives. **Toxicon**, 24: 501-505, 1986.

HENEINE, I.F.; HENEINE, L.G.D.; DANIEL, J.P.; NASCIMENTO, M.C.S. & ROCHA, O.A. Properties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination. **Anais da Acad. Ciências Est. de São Paulo**, 5711: 55-66, 1988.

HERRERA, E.; YARLEQUE, A.; CAMPOS, S. & EAVALETA, A. Gamma irradiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. **Inf. Nucl.**, 3: 1-14, 1986.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISCHIKAWA, A.K.; YAMAGUSHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F. & DIAS-da-SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. **Mem. Inst. Butantan**, 51(3): 107-115, 1989.

HOGGE, A.R. & ROMANO-HOGGE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil (2^a ed.). **Mem. Inst. Butantan**, 42/43: 373, 1978/79.

JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H. Chemical modification of histidine and lysine residues of crotoxin. **FEBS Letters**, 87: 291, 1978.

JONAH, C.D.; MATHESON, M.S.; MILLER, J.R. & HART, E.J. Yield and decay of the hydrated electron from 100 ps to 3 ns. **J. Phys. Chem.**, 80: 1267-1270, 1976.

KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.C., GATTONDE, B.B. & JOSHI, S.V. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical application. In: Radiosterilization of Medical Products. **Int. Atom. Energy Agency**, 1975.

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: Snake venoms, Ed. C. Y. LEE, Berlin, Springer-verlag, 1979, pp. 159.

KLAUBER, L.M. **Rattlesnakes: Their habits, life histories and influence on mankind**. Berkeley and Los Angeles Univ. California Press., 2 ed. 2 vols., 1533 pp., 1982.

KOCHOLATY, W.F.; GOETZ, C.J.; ASHLEY, B.D.; BILLINGS, A.T. & LEDFORD, E.B. Immunogenic response of the venoms of Fer-de-Lance, *Bothrops atrox asper*, and La Cascabella, *Crotalus durissus durissus*, following photooxidative detoxification. **Toxicon**, 5:153-158, 1968.

KONG, S. & DAVISON, A.J. The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , OH , e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. **Biochem. Biophys. Acta**, 8-29, 1980.

KONG, S. & DAVISON, A.J. The relative effectiveness of OH , H_2O_2 , O_2^- , and reducing free radicals in causing damage to biomembranes: A study of radiation damage to erythrocyte ghosts using selective free radical scavengers. **Biochem. Biophys. Acta**, 640: 313-325, 1981.

KOUYOUUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B. & JOHNSON, M.A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, 24: 575, 1986.

KUO, S. S.; SAAD, A. H.; KOONG, A. C.; HAHN, G. M.; GIACCIA, A. J. Potassium-channel activation in response to low doses of gamma irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90(3): 908-912, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LAUHATIRANANANDA, P.; GANTHAVORNI, S. & HAIADOM, V.

Radiation effects on Cobra venom. In: International Atomic Energy Agency. Radiation sensitivity of Toxins and Animal Poison: Proceedings of the Symposium on ... held in Bangkok, May 19-22, 1969. Vienna, 1969. p. 107-112.

LAURE, C.J. Die primarstruktur des crotamis. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 356: 231-235, 1975.

MELLO, L. E. A. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J. R.; CAVALHEIRO, E. A. Convulxin does not induce convulsions when inject into the rat dorsal hippocampus. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, 39(4): 353-358, 1990.

MILLIGAN, J. R.; AGUILERA, J. A.; WARD, J. F. Variation of single-strand break yield with scavenger concentration for the SV 40 minichromosome irradiated in aqueous solutions. **Radiat. Res.**, 133(2): 158-162, 1993.

MOROZ, C.; GOLDBLUM, N. & VRIES, A. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboximethyl - cellulose - bound neurotoxin as antigen. **Nature**, 16: 697-698, 1963.

MOURA-GONÇALVES, J. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 22: 141-150, 1950.

MOURA-GONÇALVES, J. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras

II. *Crotalus terrificus crotaminicus* subespécie biológica. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 28: 365-367, 1956.

MOURA-GONÇALVES, J. & ARANTES, E.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras III. Determinação quantitativa da crotamina no veneno de cascavel brasileira. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 28: 369- 371, 1956.

MOUSSATCHÉ, H. & DUARTE-VIEIRA, G. Sobre o mecanismo da contratura produzida pelo veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 25: 249-258, 1953.

MURATA, Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo, 1988.

MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H.G.; SILVA, W.D. & ROGERO, J.R. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities .In: International Society on toxinology Pan American Section - III Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. México, 9-12 january 1990, p93.

NAKAZONE, A.K.; ROGERO, J.R. & GONÇALVES, J.M. Crotoxin. I. Immunology and Interaction of the Subunits. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 17: 119-128, 1984.

NASCIMENTO, N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada- Aspectos bioquímicos e farmacológicos**. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo, 1991.

NAYAR, G.N.A. & SPINIVASAM, S. The effects of gamma irradiation on solutions of acetylcholinesterase **Radiat. Res.**, 65: 657-661, 1975.

NYGAARD, O. F. & SIMIC, M. G. **Radioprotectors and Anticarcinogens**. Acad. Press. New York, 1983.

OKONOGLI, T.; HATTORI, Z.; OGISO, A. & MITSUI, S. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. **Toxicon**, 17: 524-527, 1979.

OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. **Prog. Allergy**, 5: 1-78, 1958.

OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Rattlesnake venoms their actions and treatment. Ed. A. T. TU, New York, Marcel Dekker, 1982, p. 163-209.

POSSANI, L.D.; CASTRO, J.F. & JULIÁ, J.Z. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius hoffmann*) venom. **Toxicon**, 19(2): 323-329, 1981.

PRADO-FRANCHESCHI, J. **Estudo sobre a convulxina**. (Tese de doutoramento, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil) Campinas, 1970.

PRADO-FRANCHESCHI, J.; TAVARES, D.Q.; HERTEL, R.; LOBO DE ARAUJO, A. Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom, on plaquets and leukocytes of anesthetized rabbits. **Toxicon**, 19: 661-668, 1981.

PRADO-FRANCHESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 19: 875-887, 1981.

PURANANANDA, C. Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1972.

PURANANANDA, C.; HAYODOM, V.; LAOHATIRANANDA, P. & GANTHAVORN, S. Study of immune response to irradiated Cobra venom in rabbits. **J. Nat. Res. Conc. Thailand**, 8-9 : 17-27, 1976/77.

RAEL, E. D.; MARTINEZ, M.; MOLINA, O. Isolation of a fibrinolytic protease, M4, from venom of *Crotalus molossus molossus* (northern blacktail rattlesnake). **Haemostasis**, 22(1): 41-49, 1992.

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of trombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 19: 333-338, 1986.

RELYVELD, E.M. & BEN-EFRAIM, S. Preparation of vaccines by the action of glutaraldehyde on toxins, bacteria, viruses, allergens and cells. **Meth. Enzimology**, 93: 24-60, 1983.

RIBEIRO, L.A.; PIRES de CAMPOS, V.A.F.; ALBUQUERQUE, M.V. & TAKAOKA, N.Y. Epidemiological and clinical aspects of accidents due to poisonous snakes in the States of São Paulo, Brazil from 1986 to 1988. In: International Society on Toxinology Pan American Section- III Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Mexico, 9-12 January, 86pp., 1990.

ROGERO, J.R. **Toxinas do Veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Interação proteína- proteína e cinética da troca isotópica hidrogênio-trício.** (Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP) São Paulo, 1978.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex I. subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 270: 274-279, 1971.

SALAFRANCA, E.S. Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, 24: 60, 1973.

SANO-MARTINS, I.S. & DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, 30: 141-150, 1992.

SAWAI, Y. Vaccination against snake bite poisoning. In: Snake venoms, Ed. C. Y. LEE, Berlin, Springer-Verlag, 1979. v. 52, ch. 23, p. 881-897.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotoamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, 129: 1361-1363, 1959 a.

SCHENBERG, S. Análise da crotamina do veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. **Mem. Inst. Butantan São Paulo**, 29: 213-226, 1959 b.

SILVA, A.M.P.; NOVAES, G.; HENEINE, I.F. The effect of dithiothreitol on the activity of tityustoxin from the scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Toxicology Letters**, 71: 97-101, 1994.

SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRA T,H. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavél. **Mem. Inst. Butantan**, 12: 505-513, 1938.

SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos - Reconhecimento, distribuição geográfica. Produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos.** Livraria Atheneu Editora. R.J., S.P., 138 pp, 1990.

SOUZA-FILHO, J.N. **Efeitos da radiação ionizante na crotoxina (Toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*): Estudos ao nível molecular.** (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo, 1988.

SOUZA-FILHO, J.N.; GUARNIERI-CRUZ, M.C.; MURATA,Y. & ROGERO, J.R. Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25: 103-113,1992.

STECK, G.; LEUTHARD, P. & BÜRK, R.R. Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polyacrilamide gels by formaldehyde fixation. **Anal. Biochem.**, 107: 21-24, 1980.

SUNDARAM, K.; PHILIP, J. & BHATT, M.B. Radiation effects on *Naja naja* venoms and polyvalent antisera. In: Radiation sensitivity of toxins and animal poisons: Symposium on ... held in Bangkok, May 19-22, 1969. Vienna, 1970.

TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M. & ADELINO, M.E.F. Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 27: 115-122, 1985.

TAKEYA, H.; ONIKURA, A.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; IWANAGA, S. Primary structure of a hemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus ruber ruber*. **Journal of Biochemistry**, 108(5): 711-719, 1990.

TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A. The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. **Toxicon**, 8: 225-33, 1970.

THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.j. & REID, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **Lancet**, 2: 639-641, 1977.

VARGAFTIG, B.B.; PRADO-FRANCHESCHI, J.; CHIGNARD, M.; LEFORD, J.; MARLAS, G. Ativation of guinea pig platelets induced by a convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Eur. J. Pharmacol.**, 68: 451-463, 1980.

VARGAFTIG, B.B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHIGNARD, M.; CHEVANCE, L.G. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. **Eur. J. Pharmacol.**, 92: 57-68, 1983.

VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of cristaline crotoxin- II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, 33: 981, 1966.

VITAL-BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol., London**, 212: 34p., 1971.

VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake venoms. **J. Formoson. Med. Assc.**, 71: 394, 1972.

VITAL-BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 26: 212-218, 1980.

Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas

WEISS, J. F. & SIMIC, M. G. Perspectives in radioprotection. **Pharmacol. Ther.**, 39: 401-407, 1988.

WHO. Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms, **WHO offset publication**, 58, Geneva, 1981.

WORM, K. H.; KLIMCZAK, U.; SCHULTE-FROHLINDE, D. Radiosensitization and radioprotection of *E. coli* by alcohols. **Int. J. Radiat. Biol.**, 64(5): 485-495, 1993.