



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co
NAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS, BIOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS DO VENENO DE *Bothrops jararaca*.**

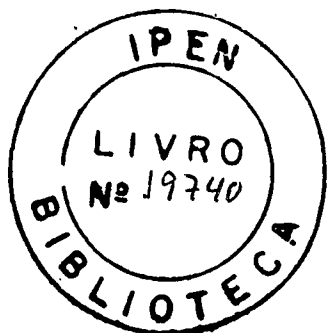
MÍRIAM CAMARGO GUARNIERI

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

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
1992

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co
NAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS, BIOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS DO VENENO DE *Bothrops jararaca*.



MÍRIAM CAMARGO GUARNIERI

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Rogero

AGRADECIMENTOS

Tantos foram os Institutos e pessoas que colaboraram na execução desse trabalho, que seria impossível citá-los nominalmente sem que alguém fosse esquecido. Desta forma, agradeço e dedico a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução do mesmo.

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co
NAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS, BIOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS
DO VENENO DE *Bothrops jararaca*.

Míriam Camargo Guarnieri

Resumo

A radiação gama, por induzir modificações diferenciais nas atividades tóxicas, enzimáticas e imunológicas das proteínas, pode ser ferramenta útil na destoxicação de venenos ofídicos. Com o intuito de estudar o mecanismo de ação e os efeitos dos raios gama no veneno de *Bothrops jararaca*, determinando a dose de radiação que atenua as atividades tóxicas e enzimáticas com manutenção das propriedades imunológicas do veneno, além dos radicais livres mais relevantes nesse processo, foi efetuado o presente trabalho. Amostras de veneno de jararaca (2 mg/ml em NaCl 0,15M) foram irradiadas com as doses de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 Gy, em uma fonte de ^{60}Co . A determinação do conteúdo proteico, espectro de absorção em UV, cromatografia em Sephacryl S-200, EGPA-SDS, atividades proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante e DL_{50} , indicaram alterações conformacionais, formação de agregados proteicos e atenuação das atividades testadas proporcionalmente a dose de radiação recebida. Os resultados da imunodifusão, "immunoblotting", imunoprecipitação, imunização de camundongos e coelhos, e testes de neutralização, mostraram a manutenção das pro-

priedades antigênicas e imunogênicas das amostras irradiadas e diminuição da capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pelos venenos irradiados com 3000 e 4000 Gy. Uma vez que as propriedades imunológicas foram mais radorresistentes que as demais, foi possível determinar a dose de 2000 Gy, como a dose de radiação "ideal" a ser utilizada no tratamento de venenos botrópicos, visando a melhoria do processo de obtenção de antissoros. O estudo do mecanismo de ação da radiação gama processou-se pela irradiação das amostras com a dose de 2000 Gy na presença de "scavengers" de elétrons hidratados (e^{-aq}) e radicais hidroxila (OH^{\bullet}). Os resultados mostraram a participação dos radicais hidroxila nas alterações conformacionais, na estrutura e na atenuação da atividade coagulante do referido veneno, e de ambos radicais (e^{-aq} e OH^{\bullet}) na atenuação das atividades proteolítica, hemorrágica e edemaciante.

STUDY OF ^{60}Co GAMMA RADIATION EFFECTS ON THE
BIOCHEMICAL, BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES
OF THE *Bothrops jararaca* VENOM.

Miriam Camargo Guarnieri

Abstract

Gamma radiation, by inducing different modifications on the toxic, enzymatic and immunological activities of proteins, could be an useful implement for detoxification of snake venoms. The present work was done to study the mechanism of action and effects of gamma rays on the *Bothrops jararaca* venom, determining the radiation dose that attenuates the toxic and enzymatic activities maintaining the immunological properties of venom, and also the most important free radicals on this process. The jararaca venom samples (2 mg/ml in NaCl 0.15M) were irradiated with doses of 500; 1,000; 2,000; 3,000 e 4,000 Gy, by ^{60}Co source. The determination of proteic contents, UV absorption spectrum, Sephacryl S-200 chromatography, SDS-PAGE, proteolytic, coagulant, hemorrhagic and edema-forming activities and LD₅₀, indicated conformational and structural alterations, formation of proteic aggregates and attenuation of activities tested, proportional to the radiation dose received. The results of immunodiffusion, immunoblotting, immunoprecipitation, immunization of mice and rabbits, and neutralization tests, showed the maintenance of antigenic

and immunogenic properties and decrease of neutralizing capacity of antibodies induced by 3,000 and 4,000 Gy irradiated venom. Since the immunological properties were the most radioresistant, it was possible to determine the dose of 2,000 Gy, as the "ideal" radiation dose in the treatment of bothropic venoms aiming the improvement of the immunization schedule to obtain bothropic antisera. The study of gamma radiation action mechanism was proceeded by irradiation of samples with 2,000 Gy dose in presence of different concentrations of scavengers of hydrated electrons (e^-_{aq}) and hydroxyl radicals (OH^\bullet). The results showed the participation of hydroxyl radicals in the conformational and structural alteration and also the attenuation of the coagulant activity, and both radicals (e^-_{aq} and OH^\bullet) in the proteolytic, hemorrhagic and edema-forming activities.

ÍNDICE

	Página
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- OBJETIVOS.....	18
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1- MATERIAIS.....	19
2- MÉTODOS.....	20
2.1.- Irradiação das amostras em diferentes doses de radiação.....	20
2.1.1.- Análise bioquímica e biológica.....	21
2.1.1.1.- Concentração proteica.....	21
2.1.1.2.- Espectro de absorção em ultravioleta.....	22
2.1.1.3.- Cromatografia em Sephacryl S-200.....	23
2.1.1.4.- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS).....	25
2.1.1.4.1.- EGPA-SDS na presença de agentes redutores.....	26
2.1.1.4.2.- EGPA-SDS na ausência de agentes redutores.....	29
2.1.1.5.- Análise das atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas.....	29
2.1.1.5.1.- Atividade proteolítica.....	30
2.1.1.5.2.- Atividade coagulante.....	31
2.1.1.5.3.- Atividade hemorrágica.....	34

2.1.1.5.4.- Atividade edemaciante.....	35
2.1.1.5.5.- Toxicidade.....	37
2.1.2.- Análise imunológica.....	39
2.1.2.1.- Imunodifusão dupla radial.....	39
2.1.2.2.- "Immunoblotting".....	40
2.1.2.3.- Imunoprecipitação.....	41
2.1.2.4.- Capacidade imunogênica.....	43
2.1.2.4.1.- Processo de imunização.....	43
2.1.2.4.2.- Detecção de anticorpos.....	44
2.1.2.5.- Neutralização de atividades biológicas.....	45
2.1.2.5.1.- Produção de antivenenos.....	46
2.1.2.5.2.- Precipitação da fração IgG por Sulfato de amônio.....	47
2.1.2.5.3.- Concentração proteica.....	48
2.1.2.5.4.- Neutralização de atividade hemorrágica.....	48
2.1.2.5.5.- Neutralização de atividade edemaciante.....	50
2.2.- Irradiação na presença de "scavengers".....	52
2.2.1.- Concentração proteica.....	53
2.2.2.- Espectro de absorção em ultravioleta.....	53
2.2.3.- Cromatografia em TSK G 3000 (HPLC).....	54
2.2.4.- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, na presença e ausência de agentes redutores.....	55

2.2.5.- Atividades enzimáticas e biológicas.....	55
2.2.5.1.- Atividade proteolítica.....	55
2.2.5.2.- Atividade coagulante.....	55
2.2.5.3.- Atividade hemorrágica.....	56
2.2.5.4.- Atividade edemaciante.....	56
2.2.5.5.- Cálculo do percentual de radioproteção.....	57
2.3.- Análise estatística.....	57
IV- RESULTADOS.....	59
1.- Irradiação em diferentes doses.....	59
1.1.- Análise bioquímica e biológica.....	59
1.1.1.- Concentração proteica.....	59
1.1.2.- Espectro de absorção em ultravioleta....	60
1.1.3.- Cromatografia em Sephacryl S-200.....	62
1.1.4.- Eletroforese em EGPA-SDS.....	67
1.1.4.1.- EGPA-SDS na presença de agentes redutores.....	67
1.1.4.2.- EGPA-SDS na ausência de agentes redutores.....	70
1.1.5.- Atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas.....	71
1.1.5.1.- Atividades enzimáticas e biológicas.	71
1.1.5.2.- Toxicidade.....	78

1.2.- Análise imunológica.....	80
1.2.1.- Imunodifusão dupla radial.....	80
1.2.2.- "Immunoblotting".....	81
1.2.3.- Imunoprecipitação.....	82
1.2.4.- Capacidade imunogênica.....	83
1.2.5.- Capacidade Neutralizante.....	85
1.2.5.1.- Imunização.....	85
1.2.5.2.- Concentração proteica da fração IgG	85
1.2.5.3.- Neutralização de atividade hemorrágica.....	86
1.2.5.4.- Neutralização de atividade edemaciante.....	88
2.- Irradiação com a dose de 2000 Gy, na ausência e presença de "scavengers".....	89
2.1.- Concentração proteica.....	89
2.2.- Espectro de absorção em ultravioleta.....	90
2.3.- Cromatografia em TSK G 3000 (HPLC).....	97
2.4.- Eletroforese em EGPA-SDS.....	103
2.5.- Atividades enzimáticas e biológicas.....	105
V- DISCUSSÃO.....	112
VI- CONCLUSÕES.....	123
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

I-INTRODUÇÃO

O VENENO DE *Bothrops jararaca*

Estima-se a existência de 2000 a 2500 espécies de serpentes sendo cinquenta por cento peçonhentas. Estas distribuem-se em 5 famílias: *Elapidae*, *Viperidae*, *Crotalidae*, *Hydrophidae* e *Colubridae*¹⁴.

No Brasil, as serpentes de importância médica são representadas pelos gêneros: *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), pertencentes à família *Crotalidae*, e pelo gênero *Micrurus* (corais), pertencente à família *Elapidae*^{5,14,21}.

O gênero *Bothrops*, o maior representante em número de espécies e subespécies, distribui-se por todo território brasileiro^{5,67,128}. A serpente *Bothrops jararaca* só não é encontrada nos estados do norte do país e região nordeste do Maranhão, sendo responsável por 90% de todos os acidentes registrados no sudeste do Brasil²¹.

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90%), carboidratos (10 a 30%) e em pequenas proporções, lipídeos, amins biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos^{14,35}. Os metais desempenham papel importante na estabilização e balanceamento da carga de íons de estruturas proteicas e no mecanismo de catálise de reações enzimáticas^{12,14,131}.

Os venenos botrópicos apresentam uma grande variedade de enzimas: fosfolipase A₂, L aminoácido oxidase, hialuronidase, cininogenase, enzimas trombina-símile, ativadoras de fator X e protrombina, além de várias esterases, endopeptidases e fosfatases^{35,70}.

Embora esses venenos sejam extremamente complexos e heterogêneos quanto à sua composição^{24,42}, seus efeitos são característicos e de maneira geral decorrentes de ações proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes^{5,15,90,91}.

Ação proteolítica

Nos acidentes botrópicos as lesões locais foram atribuídas, por muitos autores, exclusivamente à atividade proteolítica desses venenos^{74,127,128}. Hoje, acredita-se que essas lesões podem ser devidas às múltiplas ações biológicas de uma única toxina do veneno, por efeitos combinados de duas ou mais toxinas ou mesmo devido aos efeitos sinérgicos das mesmas^{5,90,110,119}. Segundo Selistre e colaboradores¹³⁹, a patogênese das lesões locais pode ser atribuída, primariamente, às atividades de proteases, fosfolipases, fatores hemorrágicos e, secundariamente, à liberação de agentes vasoativos como bradicinina e histamina.

Várias metaloproteínas com atividades proteolítica e hemorrágica foram isoladas do veneno de jararaca, sendo classificadas de acordo com a atividade predominante e especificidade pelo substrato^{8,90,91,92,93,147}.

As metaloproteínas com atividade proteolítica predominante são definidas como enzimas que possuem baixa especificidade, alta atividade proteolítica em substratos convencionais como caseína e que podem produzir hemorragia em animais, quando injetadas em grandes quantidades^{7,91,143,147}.

Três enzimas proteolíticas foram isoladas do veneno de jararaca: (1) botropasina, metaloproteína ácida com peso molecular de 48 KDa, ativa em caseína e outros substratos, que induz mionecrose e necrose arterial e, quando injetada na dose de um micrograma causa hemorragia⁹¹; (2) J protease, zinco metaloproteína com peso molecular de 23 KDa, que requer a presença de cálcio para sua ativação¹⁴⁷; (3) Bothrops protease A, serino protease ácida, termorresistente, glicoproteína com peso molecular de 65 KDa, ativa sobre caseína e outros substratos^{92,123}.

Ação hemorrágica

Além dos fenômenos hemorrágicos locais, os venenos botrópicos são capazes de produzir, após sua absorção, hemorragias em vários tecidos e órgãos do organismo^{5,110}. As toxinas hemorrágicas, também denominadas "hemorraginas"⁵¹ ou "fatores hemorrágicos"⁹², são diretamente responsáveis pelo sangramento local e sistêmico⁷⁵. Estas podem ser definidas como enzimas proteolíticas de alta especificidade pelo substrato, que induzem hemorragia quando injetadas em animais em quantidades da ordem de nanogramas, não sendo

necessariamente ativas sobre caseína e frequentemente ativas sobre fibrinogênio e colágeno^{92,100,114,134,155}.

Três fatores hemorrágicos (HF1, HF2 e HF3) foram isolados do veneno de jararaca: metaloproteínas ácidas, termolábeis, com pesos moleculares similares (49-62 KDa) e que possuem pequena (HF2) ou nenhuma (HF1 e HF3) atividade sobre caseína^{90,92}. Segundo Queiroz e colaboradores¹²⁰, essas toxinas atuam nos capilares destruindo a membrana basal e facilitando a saída de hemácias íntegras através de pequenas fendas endoteliais.

Ação coagulante

A maioria dos venenos exibem, simultaneamente, mais de um tipo de ação sobre a coagulação sanguínea: (1) conversão do fator X em fator X ativado; (2) conversão de protrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); (3) conversão de protrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e (4) conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina-símile)^{5,32,33,106,113}.

Duas frações foram isoladas do veneno de jararaca: uma agindo diretamente no fibrinogênio, com peso molecular estimado em 71 KDa e outra capaz de ativar o fator X na presença de fator V, fosfolipídeos e cálcio, concentrada em uma fração de peso molecular 83 KDa^{31,43,106}. Nahas e colaboradores¹⁰⁶, realizando um estudo comparativo dos diversos mecanismos de ação coagulante, promovidos pelos venenos botrópicos, evidenciaram no veneno de *B. jararaca*,

além das atividades descritas anteriormente, a capacidade deste veneno ativar a protrombina diretamente.

Embora o veneno de jararaca seja coagulante *in vitro*, suas atividades promovem o consumo de fatores de coagulação, principalmente o fibrinogênio, e ativam o sistema fibrinolítico causando, *in vivo*, incoagulabilidade sanguínea^{5,76,126}. Com a ativação do fator X ocorre consumo dos fatores V, VIII e plaquetas, podendo levar a um quadro de coagulação intravascular disseminada e a deposição de microtrombos na parede capilar, que poderiam contribuir para o desencadeamento de insuficiência renal aguda^{5,76}. A trombocitopenia observada *in vivo*, também pode ser decorrente da ação da coaglutinina (botrocetina), que possui atividade agregante plaquetária na presença do fator de von Willebrand^{76,122}. Os distúrbios na coagulação sanguínea podem também agravar as alterações hemorrágicas locais e sistêmicas⁵.

Alguns efeitos do envenenamento botrópico, como indução de edema e necrose, são decorrentes da ação conjunta de enzimas proteolíticas, hemorrágicas, coagulantes e de outras proteínas farmacologicamente ativas^{54,110}.

O edema é relevante do ponto de vista clínico^{5,128}, tanto pela sintomatologia apresentada no envenenamento, quanto pela dificuldade de neutralizá-lo *in vitro*^{53,86} e *in vivo*¹²⁵. Segundo Gutiérrez & Lomonte⁵⁴, este efeito pode ser atribuído à ação conjunta de: toxinas hemorrágicas; toxinas

que aumentam a permeabilidade das células endoteliais; fosfolipases ou citotoxinas que induzem a liberação de histamina dos mastócitos; fosfolipases A₂ que liberam ácido aracdônico dos fosfolipídeos nas membranas celulares, iniciando a via que leva à síntese de prostaglandinas; C3a e C5a, componentes do sistema complemento, que participam dos processos inflamatórios; e proteinases que têm como substratos os cininogênios plasmáticos, liberando bradicininas.

A atividade miotóxica dos venenos botrópicos, normalmente está correlacionada às proteínas básicas de peso molecular na faixa de 13-18 KDa¹⁰². Embora Moura da Silva e colaboradores¹⁰² tenham detectado, no veneno de *B. jararaca*, concentrações extremamente baixas dessas proteínas, nas primeiras horas após o envenenamento, pode-se observar necrose de fibras musculares. Segundo Queiroz e colaboradores^{119,120}, a mionecrose observada pode ser decorrente da isquemia causada pela drástica hemorragia e necrose das artérias intramusculares. Por outro lado, Gutiérrez & Lomonte⁵⁴ sugerem que as toxinas hemorrágicas também possam exercer atividade miotóxica direta, semelhante à observada em hemorraginas isoladas do veneno de *Crotalus viridis*, *Crotalus atrox* e *Crotalus ruber ruber*.

Além da mionecrose, no envenenamento botrópico também pode ser observada necrose do córtex renal. Alguns mecanismos poderiam explicar esse efeito: coagulação

intravascular, ação proteolítica direta no endotélio vascular, vaso espasmo ou ação conjunta dos mesmos⁴.

O quadro clínico do envenenamento botrópico caracteriza-se por dor imediata, hemorragia e aumento do tempo de coagulação nas primeiras horas; edema, calor e rubor locais dentro das primeiras seis horas e, nas doze horas subsequentes, bolhas, equimose, necrose, oligúria e anúria^{4,127}. A gravidade do envenenamento depende, entre outros fatores, da quantidade e composição do veneno (determinada pela idade, habitat e espécie da serpente), estado geral e idade da vítima²⁴. Geralmente, após tratamento adequado as vítimas recuperam-se dos efeitos sistêmicos, evitando a morte; entretanto, o dano local pode ser inevitável, acarretando a perda da extremidade de um membro^{69,90}.

É importante ressaltar que a soroterapia é o único tratamento de eficácia comprovada e quando administrada, o mais cedo possível, pode evitar a amputação⁵.

O soro antibotrópico é produzido a partir da imunização de equínos com um "pool" de sete venenos, sendo o veneno de *Bothrops jararaca* o constituinte de 50% da mistura³⁶. Esses venenos têm se mostrado bons imunógenos, porém, com relativa frequência, são observadas reações locais e sistêmicas que podem influenciar a produção do antissoro, levar à diminuição do tempo de sobrevivência ou mesmo à morte dos animais soroprodutores⁵².

Por outro lado, nos acidentes em humanos causados por ofídios, algumas vezes o desenvolvimento das lesões, quando grandes quantidades de veneno são introduzidas no corpo da vítima, é tão rápido que o antissoro não neutraliza os seus efeitos letais⁶⁰.

Por essas razões, vários métodos de destoxicação têm sido propostos com o intuito de tornar os venenos ofídicos imunógenos mais adequados ou mesmo utilizá-los, quando atóxicos, na forma de vacinas.

MÉTODOS DE ATENUAÇÃO - RADIAÇÃO GAMA

Vários métodos, químicos e físicos, foram utilizados na tentativa de destoxicar venenos de diferentes espécies de serpentes. Destacam-se: tratamento com agentes quelantes^{46,48,65}, formalina^{9,136}, glutaraldeído^{52,116,124}, iodo^{11,61}, tanino¹¹¹, formaldeído²⁶, carboximetil celulose¹⁰¹, calor²⁶, fotooxidação na presença de azul de metileno⁸⁰, radiação X⁴¹ e ultravioleta¹⁴⁸.

Porém, a maioria dos métodos estudados não foram eficazes na combinação de altos níveis de atenuação e manutenção da imunogenicidade. Dentre os que obtiveram resultados satisfatórios podemos citar os trabalhos de Sawai¹³⁶ e Aung-Khin e colaboradores⁹ que utilizando formalina, reduziram a toxicidade e efeitos locais decorrentes dos venenos de *Vipera russeli*, *Trimeresurus flavoviridis* e suas toxinas hemorrágicas, com manutenção das

propriedades imunogênicas. Heneine e colaboradores⁶¹ utilizaram o método de iodação, Guidolim e colaboradores⁵² o glutaraldeído, ambos obtiveram imunógenos adequados de venenos crotálicos, embora os mesmos tratamentos tenham reduzido as propriedades imunogênicas de venenos botrópicos. Por outro lado, Higashi e colaboradores⁶⁵ utilizando o pré-tratamento de venenos botrópicos com inibidores de proteinases e Tejasen & Ottolenghi¹⁴⁸ submetendo o veneno de *Agkistrodon piscivorus* à radiação ultravioleta, observaram a redução da toxicidade e atividades enzimáticas com manutenção das propriedades imunológicas.

A radiação gama também vem sendo empregada como agente atenuante de venenos ofídicos mostrando resultados promissores.

Esta radiação eletromagnética, formada a partir de transições nucleares, tem como características: alta energia associada, ausência de massa, grande poder de penetração e capacidade de promover excitações e ionizações no meio onde se propaga⁵⁰.

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 e 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 ultravioleta⁵⁰. A radiação, inicialmente absorvida através

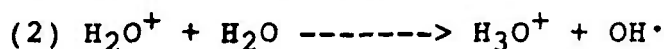
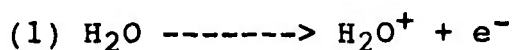
dos processos de ionização e excitação, é retransferida para outros átomos e moléculas produzindo várias espécies reativas, principalmente radicais livres.

Um radical livre é um átomo ou molécula neutra com um único elétron do orbital exterior desemparelhado, tem uma vida mais longa do que a de um par de íons, além de ser altamente reativo, quer doando seu elétron desemparelhado, quer combinando-o pela captura de um elétron de outro átomo⁵⁰. Cada uma dessas interações pode gerar íons adicionais ou radicais livres secundários, que podem provocar modificações permanentes na estrutura físico-química do material irradiado¹⁸. Essas modificações ocorrem de forma direta, quando o próprio alvo biológico é excitado e ionizado, e de forma indireta, quando o ataque aos alvos é mediado pelas espécies reativas da água¹⁸.

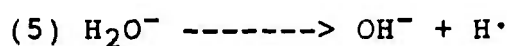
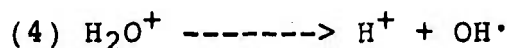
A irradiação de proteínas em solução aquosa tem sido utilizada, com muita frequência, por proporcionar os mesmos efeitos da irradiação à seco, com o uso de doses menores de radiação^{84,118}. Nessas condições, o efeito indireto é predominante tornando as espécies reativas da água particularmente importantes³⁷.

Na radiólise da água, o processo de ionização possui maior relevância porque a energia de excitação pode ser simplesmente convertida em calor ou formar radicais livres e espécies moleculares semelhantes às produzidas na ionização¹⁸.

A ionização da água ocorre em pico segundos pela formação de radicais livres hidroxila e elétron hidratado (e^-_{aq})^{18,38}.

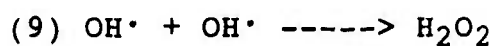
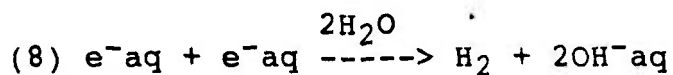
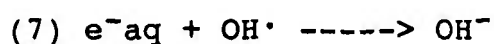
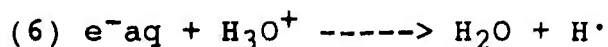


Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis podendo dissociar-se em:

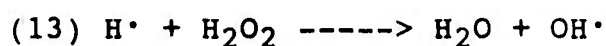
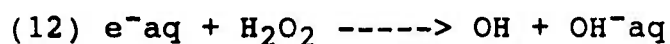
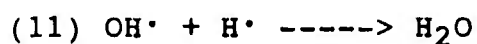
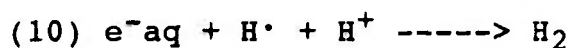


A deposição de energia na água irradiada não é uniforme; seus produtos primários, com exceção do elétron hidratado, são formados em regiões restritas de aproximadamente 2 nm de raio, denominadas "spurs"^{88,140}. A concentração de $\text{H}\cdot$ e e^-_{aq} pode atingir 10 e 100 mM, respectivamente; enquanto no núcleo do "spur", $\text{H}\cdot$ e $\text{OH}\cdot$ podem ser formados em concentrações de aproximadamente 0,5 e 2 M, respectivamente^{37,71,140}.

A reatividade desses radicais é tão grande que entre 10^{-14} e 10^{-12} segundos, eles podem colidir formando espécies reativas secundárias^{18,47,58}.

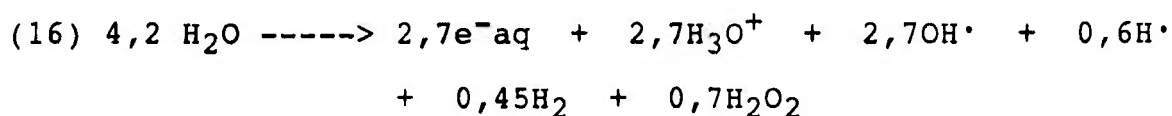


Quando o "spur" aumenta e os produtos difundem-se, interagindo com o meio ao redor, estes sofrem reações com outros radicais formando moléculas neutras e radicais secundários como produtos^{58,146,151,152}.



À 10^{-3} segundos, com a finalização das reações dos radicais livres primários, é formada uma solução homogênea de produtos da radiólise da água. Nessas condições, as concentrações dos radicais livres já diminuíram e são menores que as formadas inicialmente no núcleo do "spur".

Essas espécies, juntamente com seus respectivos rendimentos, para 100 eV de energia absorvida (valor de G), destacam a importância dos radicais livres hidroxila e elétrons hidratados (equação 16)⁴⁴.



O radical hidroxila é destacado por muitos autores, como o grande promotor do dano a macromoléculas^{2,3,22,44,49}. Este reage com proteínas principalmente pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa e de grupos sulfidrilas, além de

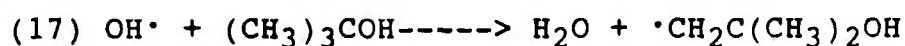
reagir com anéis aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos¹⁷. Greestock⁴⁹ destaca o aparecimento de radicais OH[•] adicionais, na presença de íons metálicos, fazendo parte das reações de adição, oxidação e abstração. A reação dos OH[•] com vários sítios diferentes é o maior obstáculo para o entendimento do mecanismo de inativação de proteínas^{2,3,18,44}.

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^{17,18,44}.

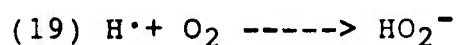
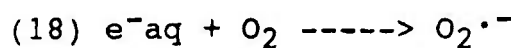
As lesões primárias, produzidas pela absorção de energia da radiação, embora distribuídas ao acaso através de toda molécula protéica, podem estabilizar-se em sítios favoráveis por transferência de energia intramolecular e rearranjo^{34,38}. As reações iniciadas pelos radicais primários (OH[•] e e⁻aq) podem induzir mudanças nas estruturas primária, pela destruição de aminoácidos específicos e quebra de cadeias polipeptídicas; secundária e terciária, pela desestabilização de pontes de H e S-S, agregação e desdobramento da molécula, e quaternária, pela dissociação de subunidades; levando a alterações nas propriedades tóxicas, enzimáticas e imunológicas ou até mesmo a perda de atividade biológica das proteínas^{1,13,17,18,22,34,44}.

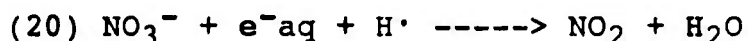
A extensão do dano da radiação pode ser estudada e modificada pela adição, no momento da irradiação, de "scavengers" que possuem a capacidade de remover do meio espécies reativas particulares²². A eficiência na remoção desses radicais e conseqüente proteção das moléculas de interesse, depende da adequação do "scavenger" e sua concentração, além da reatividade dos produtos "scavenger"-radical livre ao sistema^{1,2,30}.

Compostos com radicais sulfidrilas, por serem doadores de H, são eficientes "sequestradores" de radicais OH[•], mesmo em baixas concentrações³⁰. Por outro lado, iodeto de potássio²², manitol²⁹, etanol²⁹, íon tiocianato^{1,2,3,132} e álcool butílico terciário^{3,27,29,30,38} mostram-se efetivos radioprotetores dependendo das concentrações (10⁻⁴M a 5M) e sistemas utilizados. Dentre eles, o álcool butílico terciário pode oferecer algumas vantagens por produzir radicais não reativos e que desaparecem rapidamente do processo (equação 17)¹⁸.



Como "scavengers" de e⁻aq destacam-se o oxigênio, que age convertendo H[•] e e⁻aq rapidamente a radicais ânion superóxido (equação 18) e sua forma ácida (equação 19), e íons nitrato que mostram-se efetivos sequestradores de e⁻aq mas não de OH[•] (equação 20)^{44,49,71}.





O oxigênio interage com o radical hidroxila somente em condições de pH extremamente alto, formando o íon ozonita (O_3^-)²⁷.

O efeito sensibilizador do oxigênio, principalmente a nível celular, tem sido destacado por muitos autores. Na irradiação de soluções proteicas esse efeito é atribuído à formação de H_2O_2 e OH^{\cdot} , via oxidação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por íons metálicos ou complexados, e ao próprio $\text{O}_2^{\cdot-}$, que possui baixa reatividade, mas é muito mais seletivo que o OH^{\cdot} nas reações de redução^{30,49,140}.

Além da presença do oxigênio, vários fatores interferem na obtenção do efeito final da irradiação de proteínas, como: tipo de fonte de radiação; dose, taxa de dose e temperatura de irradiação; tipo de solvente, presença de gases e radiomodificadores; estado físico, concentração, pH, toxicidade, antigenicidade e conteúdo enzimático da amostra. Dessa 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^{78,117}. Kankonkar e colaboradores⁷⁸ sugerem que esse espectro de variáveis torna a extensão do dano, induzida pela radiação, mais facilmente controlável que por métodos químicos. Esse fato, aliado à diferença de radiosensibilidade das várias funções proteicas e maior radorresistência das propriedades imunológicas levaram

vários pesquisadores a utilizarem a radiação gama como agente atenuante de venenos ofídicos.

Puranananda e colaboradores^{117,118} demonstraram que coelhos imunizados com venenos de *Naja naja* irradiados com doses acima de 30000 Gy poderiam neutralizar, *in vivo*, quantidades consideráveis de veneno nativo. Vários autores compararam os efeitos decorrentes do uso da radiação gama e tratamento com formalina nesse veneno; Salafranca¹³² concluiu que o veneno irradiado tornava-se mais imunogênico que o veneno tratado com formalina, enquanto Baride e colaboradores¹⁰ estudando, além do veneno de naja, os venenos das serpentes *Bungarus cherelatus*, *Echis carinatus* e *Vipera russeli*, concluíram que os dois tratamentos induziram a formação de complexos proteicos de alto peso molecular.

Cabe salientar que a maioria dos venenos utilizados para os estudos citados acima, pertencem a serpentes da família *Viperidae*, diferindo em sua composição e ações patofarmacológicas das peçonhas de serpentes sulamericanas.

Os estudos envolvendo venenos de serpentes brasileiras resumem-se às pesquisas de Rogero e colaboradores^{103,104,107,142}. Estes analisaram os aspectos bioquímicos, biológicos e farmacológicos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e sua principal toxina (crotoxina) submetidos à irradiação, obtendo além de altos níveis de atenuação da toxicidade e manutenção da imunogenicidade, maior capacidade neutralizante dos

atividades enzimáticas e biológicas do veneno de *Bothrops atrox* e *Lachesis muta*, evidenciando a atenuação das atividades via alteração estrutural e diferença de radiosensibilidade das várias enzimas presentes.

A alta frequência de acidentes envolvendo o gênero *Bothrops* e a necessidade de otimizar a produção de soro antiofídico, aliadas às vantagens da irradiação como método de atenuação, justificam o presente trabalho.

II- OBJETIVOS

1- Estudar os efeitos bioquímicos, biológicos e imunológicos, produzidos por diferentes doses de radiação gama, no veneno de *Bothrops jararaca*.

2- Determinar a dose de radiação que atenua as atividades tóxicas e enzimáticas do referido veneno, mantendo suas propriedades imunológicas.

3- Estudar o mecanismo de ação da radiação gama, determinando os radicais livres mais relevantes no processo de alteração das propriedades do veneno de jararaca.

III-MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1.- Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade pró-análise.

1.2.- O veneno de *Bothrops jararaca*, seco e na forma cristalina, foi cedido pelo Instituto Butantan e mantido à -20°C . O soro antibotrópico, com capacidade de neutralização de 5 miligramas de veneno botrópico por mililitro, produzido e ampolado no Instituto Butantan, foi mantido à 4°C .

1.3.- Os animais de experimentação, procedentes do biotério do Depto. de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN e do Instituto Aggeu Magalhães, foram mantidos em gaiolas com maravalha de pinho, recebendo ração comercial e água "ad libitum".

2.- MÉTODOS

2.1.- Irradiação das amostras em diferentes doses

No decorrer do trabalho, alíquotas de veneno de jararaca foram diluídas em NaCl 0,15M (salina), na concentração de 2 mg/ml e filtradas em membranas de nitrocelulose (poro 0,22 μ). As amostras, em solução aquosa e pH 7,0, foram irradiadas com raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co (tipo GAMMACEL 220 da Atomic Energy of Canada Ltda), nas doses de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 Gy, sob taxa de dose média de 850 Gy/h, na presença de oxigênio e à temperatura ambiente. As amostras irradiadas foram mantidas à -20°C até a utilização nos ensaios. Alíquotas do veneno nativo (não irradiado) foram incubadas à temperatura ambiente durante o período de irradiação de cada amostra e mantidas à -20°C até a utilização como referência nos ensaios (tabela I).

TABELA I

ALÍQUOTAS DE VENENO NATIVO EXPOSTOS
À TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE O PERÍODO
DE IRRADIAÇÃO DE CADA AMOSTRA

VENENO NATIVO	TEMPO DE INCUBAÇÃO (HORAS)
controle 500 Gy	0,75
controle 1000 Gy	1,5
controle 2000 Gy	3,0
controle 3000 Gy	4,5
controle 4000 Gy	6,0

2.1.1.- Análise Bioquímica e biológica

2.1.1.1.- Concentração proteica

Método de Lowry e cols⁸⁷ modificado por Miller⁹⁸

O conteúdo proteico das amostras foi determinado, antes e após a irradiação, para quantificar possíveis perdas por precipitação e padronizar as concentrações proteicas nas reações.

Procedimento

Em 0,2 ml de amostra foi adicionado 1 ml de reagente de tartarato de cobre (Na_2CO_3 10% - NaOH 0,5M; CuSO_4 5%; tartarato de Na e K 1%; na proporção de 1:9:100, respectivamente) mantendo-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 3 ml de reagente de Folin Ciacanteau 0,17N foram adicionados, incubando-se à 50°C por 10 minutos. Após resfriamento foram determinadas as densidades ópticas em 650 nm, em um espectrofotômetro Carl Zeiss modelo PQM-II. As amostras e cada ponto da curva padrão de albumina bovina foram determinados em quadruplicata.

Tratamento dos dados

Os dados da curva padrão foram ajustados, por uma regressão linear, a uma equação do tipo:

$$(21) Y = AX + B$$

Onde: (Y) densidade óptica ; (X) concentração proteica;
(A) coeficiente angular da reta; (B) coeficiente linear da
reta.

A partir da curva padrão foram calculadas as
concentrações proteicas das amostras e seus respectivos
desvios.

2.1.1.2.- Espectro de absorção na região ultravioleta

A absorção molecular entre 230 e 300 nm (ultravioleta
próximo) pode ser considerada decorrente dos aminoácidos
aromáticos (Phe, Tyr e Trp) além de histidina e dissulfetos.

O método foi realizado com o objetivo de verificar
modificações nas estruturas secundária e terciária das
proteínas submetidas à irradiação, através de maior ou menor
exposição dos grupos cromóforos dos aminoácidos²⁰.

Procedimento

As amostras foram analisadas na concentração de
0,2 mg/ml em solução salina, no intervalo de 235 a 330 nm,
em um espectrofotômetro de duplo feixe Cary modelo 118, com
registro automático nos vários comprimentos de onda. As
densidades ópticas das amostras foram determinadas
utilizando como branco o solvente.

2.1.1.3.- Cromatografia em Sephacryl S-200

O método foi utilizado para detectar mudanças no peso molecular das proteínas, após irradiação, utilizando um sistema de tampão não desnaturante.

Procedimento

O gel Sephacryl^R S-200 superfino (Pharmacia Upsalla Suécia), cujo intervalo de fracionamento é de 50 a 250 KDa, equilibrado com tampão Tris-HCl 0,05M - NaCl 0,08M pH 7,5, foi empacotado em coluna de vidro de 100 x 1,5 cm até a altura de 90 cm, em fluxo contínuo e, em seguida, fluxo reverso de 12 ml/h.

Padrões de peso molecular conhecido (tabela II) foram utilizados para determinação do volume de exclusão (V_o) e da curva de calibração de peso molecular.

TABELA II

PROTEÍNAS PADRÃO UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO
DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PESO
MOLECULAR DA COLUNA DE SEPHACRYL S-200

PROTEÍNAS PADRÃO	PESO MOLECULAR (Daltons)	MILIGRAMAS APLICADOS
Azul de dextrana	2000000	2,0
Aldolase	158000	1,0
Albumina bovina	66000	3,0
Ovalbumina	45000	3,5
Tripsinogênio	24000	2,9
Alfa-lactoalbumina	14200	2,0
Azul de bromofenol	670	0,2

Tanto a amostra nativa quanto as submetidas à irradiação (2 mg/ml em salina) foram liofilizadas e ressuspensas em tampão Tris/HCl 0,05M - NaCl 0,08M pH 7,5, a fim de obter a concentração de 10 mg/ml.

As amostras e os padrões foram aplicados na coluna em volume de 1 ml, coletados em frações de 1,5 ml, em coletor de frações Pharmacia modelo FRAC-200, em volume de 1,5 ml/tubo, em fluxo constante de 9 ml/h, à 4°C. A densidade óptica das frações foi determinada em 230 nm, no espectrofotômetro Cary.

Tratamento dos dados

A partir das curvas de eluição foram calculados os coeficientes de partição das proteínas padrão e frações proteicas, segundo a equação 22:

$$(22) \quad K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Onde: (K_{av}) coeficiente de partição; (V_e) volume efluente da proteína; (V_o) volume de exclusão azul de dextrana; (V_t) volume total da coluna.

A curva de calibração de peso molecular foi determinada pela relação entre os coeficientes de partição e o logaritmo de seus respectivos pesos moleculares. Os dados da curva padrão foram ajustados, por uma regressão logarítmica, a uma função do tipo:

$$(23) \quad Y = AX + B$$

Onde: (Y) logaritmo do peso molecular; (X) coeficiente de partição; (A) coeficiente angular da reta; (b) coeficiente linear da reta.

A partir da curva padrão e dos valores de K_{av} foi determinado o peso molecular das frações proteicas das amostras.

A área dos picos de absorção das amostras nativa e irradiadas, em 230 nm, foi calculada pelo programa "Analysis"¹²¹ em operação no Departamento de Processamento de Dados do IPEN, considerando a densidade óptica de cada fração eluída.

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

Método de Laemli⁸³ modificado

As eletroforeses em sistema descontínuo e desnaturante foram utilizadas para detectar mudanças, decorrentes da irradiação, no peso molecular das proteínas.

2.1.1.4.1.- EGPA-SDS na presença de agentes redutores

Para obtenção do gel de empilhamento 2,5% em tampão Tris-HCl 0,125M pH 6,8 e do gel de resolução 12,5% em tampão Tris-HCl 0,375M pH 8,75 foram utilizados os reagentes nas proporções descritas na tabela III.

TABELA III

PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA
PARA CORRIDA ELETROFORÉTICA

SOLUÇÕES	GEL EMPILHAMENTO VOLUME (ml)	GEL RESOLUÇÃO VOLUME (ml)
1-Acrilamida/ Bisacrilamida (30:0,8)	1,0	4,0
2-Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,25	-
3-Tris-HCl 1,5M pH 8,75	-	2,5
4-SDS 10%	0,05	0,1
5-Água deionizada	3,1	3,4
6-TEMED*	0,01	0,01
7-Persulfato de amônia	0,02	0,04

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

Tratamento das amostras

As amostras nativa e irradiadas, padrões de peso molecular (tabela IV) e os controles de veneno nativo (tabela I), na concentração de 2 mg/ml em salina foram desnaturados e reduzidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625M - SDS 2% - glicerol 10% - 2-mercaptoetanol 5% - azul de bromofenol 0,001%, 50% v/v) à 100°C por 3 minutos.

TABELA IV

PROTEÍNAS PADRÃO UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA
CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PESO MOLECULAR EM EGPA-SDS

PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (Daltons)
Albumina bovina	66000
Ovalbumina	45000
3-fosfato desidrogenase	36000
Anidrase carbônica	29000
Tripsinogênio	24000
Inibidor de tripsina de soja	20100
Alfa-lactoalbumina	14200

Corrida eletroforética

Foram aplicados 7 μ g e 50 μ g de proteína em cada poço, para as colorações com nitrato de prata e com coomassie, respectivamente.

Como tampão de corrida foi utilizado Tris 0,025M - glicina 0,192M, pH 8,3.

A eletroforese processou-se à 100 V, com variação de corrente de 20-30 mA, por 3 horas.

Coloração

Coomassie

Os géis foram corados com metanol 50% - ácido acético 7% - Coomassie brilliant blue R-250 0,4%, por 1 hora à 65°C e descorados com ácido acético 10% - metanol 45% à temperatura ambiente.

Nitrato de prata

Método de Wray¹⁶¹

As proteínas foram fixadas com metanol 50% - ácido acético 10% por 12 horas. Os géis foram lavados alternadamente com metanol 50% - formaldeído 0,05% por 15 minutos e água deionizada por 3 minutos, durante 2 horas; com água deionizada por 3 horas; com solução de prata amoniacal (21 ml de NaOH 0,36%; 1,4 ml de NH₄OH; 4 ml de AgNO₃ 19,4%; 73,6 ml de água deionizada) por 15 minutos; com água deionizada por 5 minutos e revelados pela adição de ácido cítrico 0,005% - formaldeído 0,019% até o aparecimento das bandas. A revelação foi interrompida pela adição de metanol e lavagem com metanol 50% - ácido acético 10% por 45 minutos. Toda técnica foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação constante, sendo todas as soluções preparadas com água deionizada.

Secagem dos géis

Evidenciadas as bandas proteicas, os géis foram colocados em solução de metanol 40% - glicerol 1% por seis horas e em seguida secos à 42°C por 12 horas, entre folhas de celofane comercial.

2.1.1.4.2.- EGPA-SDS na ausência de agentes redutores

As eletroforeses processaram-se, conforme descrito no ítem anterior, com as seguintes modificações:

- 1- Somente a coloração com nitrato de prata foi utilizada.
- 2- Beta-mercaptoetanol e uréia foram omitidos do tampão de amostra. As amostras (2mg/ml em salina) foram desnaturadas com tampão Tris-HCl 0,0625M - SDS 2% - glicerol 10% - azul de bromofenol 0,001%, 50% v/v, à 100°C por 3 minutos.
- 3- O gel de resolução foi utilizado na concentração de poliacrilamida de 10%.

2.1.1.5.- Análise das atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas

Estas metodologias foram realizadas com o objetivo de determinar a capacidade atenuante da radiação gama, comparando-se as atividades enzimáticas e biológicas mais relevantes no envenenamento botrópico e o nível de toxicidade das amostras irradiadas com a nativa.

2.1.1.5.1.- Atividade proteolítica sobre caseína

Método de Kunitz⁸² modificado por Lomonte & Gutiérrez⁸⁶

Para determinação do efeito da radiação no grupo de enzimas responsáveis pela atividade proteolítica do veneno, caseína foi utilizada como substrato.

Procedimento

Em 1 ml da amostra nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 300 e 400 µg/ml foi adicionado 1 ml de caseína 1% (segundo Hammarsten-Merk) em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

A mistura foi incubada à 37°C durante 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 4 ml de ácido tricloroacético 5%. Após 30 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados à 4500 rpm, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada Sorval RC2B.

A densidade óptica do sobrenadante em 280 nm, foi determinada em espectrofotômetro Carl Zeiss PQM-II. Como branco, foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima omitindo-se o veneno da solução. Os experimentos foram feitos em quadruplicata.

Tratamento dos dados

Para cada amostra foi obtida uma função linear do tipo:

$$(24) Y = AX + B$$

Onde: (Y) densidade óptica; (X) concentração de veneno;
(A) coeficiente angular da reta e (B) coeficiente linear da
reta.

Cálculo de atividade proteolítica

A atividade proteolítica específica de cada amostra, em Unidades/mg de veneno, foi calculada segundo a equação 25.

$$(25) \text{Atividade proteolítica em U/mg} = \frac{\text{D. O.}}{\text{mg veneno}} \times 100$$

Onde: (D.O.) mudança de densidade óptica em 30 minutos.

Para comparação das atividades proteolíticas das amostras foi calculada a porcentagem de atividade das amostras irradiadas em relação à amostra nativa.

2.1.1.5.2.- Atividade coagulante

Método de Theakston & Reid¹⁵⁰

A atividade trombina-símile dos venenos nativo e irradiados foi determinada utilizando plasma humano citratado como substrato.

Preparo do substrato

Amostras de sangue de indivíduos normais do sexo masculino foram coletadas em citrato de sódio 3,8%, na proporção de 1 parte de citrato para 9 partes de sangue. A mistura foi homogenizada e centrifugada à 3000 rpm, em centrífuga refrigerada Sorval, por 15 minutos. As amostras de plasma citratado foram mantidas à 4°C até o momento do uso.

Para efeito comparativo, em cada determinação com as amostras nativa e irradiadas foi utilizado o mesmo conjunto de amostras de plasma.

Procedimento

À 0,3 ml de plasma humano citratado, pré-aquecido à 37°C, foram adicionados 75 µl das amostras nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,1625 e 0,03125 mg/ml.

Os tempos de coagulação foram determinados automaticamente por um fibrômetro BBL (Becton Dickinson, Md, USA). Os experimentos foram feitos em triplicata e as amostras com tempos de coagulação maiores que 320 segundos foram consideradas incoaguláveis.

Tratamento dos dados

Para cada amostra foi obtida uma função linear do tipo:

$$(26) Y = A \cdot X^{-B}$$

Onde: (Y) logaritmo do tempo de coagulação; (X) logaritmo da concentração de veneno; (A) coeficiente angular da reta; (B) coeficiente linear da reta.

Cálculo da atividade coagulante

Para comparação das atividades coagulantes das amostras foram calculados os índices coagulantes (I.C.), definidos pela equação 27.

$$(27) I.C. = \frac{1000}{T.C.}$$

Onde: (T.C.) tempo de coagulação obtido por uma amostra de veneno, em uma dada concentração.

Uma vez obtidos os índices coagulantes para cada concentração de veneno, a porcentagem dos mesmos em relação ao índice coagulante da amostra nativa foi calculada, sendo considerada como atividade coagulante relativa a média entre as porcentagens de atividade para cada concentração.

2.1.1.5.3.- Atividade hemorrágica

Método de Kondo e cols⁸¹ modificado por Ownby e cols¹¹⁵

Devido à importância dos fenômenos hemorrágicos no envenenamento botrópico, foram estudados os efeitos da radiação nesse grupo de proteínas.

Procedimento

Grupos de seis camundongos fêmeas (25-30 g) foram inoculados, no dorso, com 15, 30, 45 e 60 µg de venenos nativo e irradiados. O pelo do dorso dos animais foi retirado para facilitar o inóculo das soluções de veneno pela via intradérmica, em um volume de 50 µl.

Após 1,5 horas, os animais foram sacrificados por inalação de éter, a pele removida, estendida entre placas de vidro e a área hemorrágica medida.

A hemorragia foi quantificada pelo produto das medidas transversal e longitudinal da lesão.

Tratamento dos dados

Para cada amostra foi obtida uma função linear do tipo:

$$(28) Y = AX + B$$

Onde: (Y) produto das medidas da lesão hemorrágica; (X) veneno em microgramas; (A) coeficiente angular da reta e (B) coeficiente linear da reta.

Cálculo da atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica específica, expressa em Unidades/miligrama de veneno, foi calculada segundo a equação 29.

$$(29) \text{ Atividade hemorrágica em U/mg} = \frac{\text{P.M.L.H.}}{\text{veneno(mg)}} \times 0,01$$

Onde: (P.M.L.H.) produto das medidas da lesão.

A atividade hemorrágica relativa das amostras irradiadas foi calculada considerando-se como 100% a atividade específica da amostra nativa.

2.1.1.5.4.- Atividade edemaciante

Os efeitos da radiação na atividade edemaciante do veneno de jararaca foram avaliados, por esta atividade mostrar-se muito importante do ponto de vista clínico do envenenamento.

Procedimento

Grupos de 6 camundongos machos (20-25 g) foram inoculados nas patas posteriores; uma recebendo 1, 2, 3, 4 e 5 µg de amostra e outra salina (controle), pela via subplantar e em um volume de 50 µl.

O volume das patas foi medido antes do inóculo e após 4 horas, por pletismografia.

Tratamento dos dados

Para cada amostra foi obtida uma função linear do tipo:

$$(30) Y = AX + B$$

Onde: (Y) % de edema ; (X) veneno em ug; (A) coeficiente angular da reta e (B) coeficiente linear da reta.

Cálculo de atividade edemaciante

A % de edema de cada pata foi calculada segundo a equação 31:

$$(31) \% \text{ edema} = \frac{V_f - V_i}{V_i} \times 100$$

Onde: (Vi) volume inicial, antes do inóculo; (Vf)= volume final, 4 horas após o inóculo.

A % de edema, devido a ação dos venenos, foi obtida pela diferença entre a porcentagem de edema da pata inoculada com a amostra e a porcentagem de edema da pata controle.

A atividade edemaciante específica, expressa em Unidades/miligrama de veneno foi calculada segundo a equação 32:

$$(32) \text{ Atividade edemaciante em U/mg} = \frac{\% \text{ edema}}{\text{mg veneno}} \times 0,1$$

A porcentagem de atividade edemaciante das amostras irradiadas foi calculada considerando-se como 100% a atividade da amostra nativa.

2.1.1.5.5.- Toxicidade

Método de Villarroel e cols¹⁵⁸

O teor de toxicidade das amostras foi avaliado pela determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos, calculada segundo o manual da World Health Organization¹⁶⁰, pelo método de Sperman-Karber.

Procedimento

Camundongos machos (18-22 g) foram divididos em grupos de 5 animais, sendo 6 grupos por amostra e mais um grupo controle. As amostras e a solução salina (controle) foram inoculadas pela via intraperitoneal, em um volume de 0,5 ml, nas concentrações obtidas pela diluição das amostras a partir das concentrações iniciais, descritas na tabela V, utilizando 1,5 como fator de diluição.

TABELA V

CONCENTRAÇÕES INICIAIS PARA
DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

AMOSTRAS	VENENO (mg)/ ANIMAL
NATIVA	0,1367
500 Gy	0,2050
1000 Gy	0,3077
2000 Gy	0,4602
3000 Gy	0,6880
4000 Gy	2,5627

* FATOR DE DILUIÇÃO= 1,5

A sobrevivência dos animais foi anotada 48 horas após o inóculo das amostras.

Cálculo da DL₅₀

Para o cálculo da DL₅₀ foi utilizada a equação 33:

$$(33) m = X_{100} + d/n (\sum r - n/2)$$

Onde: (m) log DL₅₀; X₁₀₀ = log da quantidade de veneno onde se obteve 100% de mortes para todas os grupos inoculados com quantidades superiores; (d) log do fator de diluição; (r) número de camundongos que morreram em cada grupo; (\sum) somatória de todas as quantidades de veneno que se encontram entre X₁₀₀ e X₀ inclusive; (X₀) log da quantidade de veneno onde se observou 100% de sobrevivência, obtendo-se a mesma sobrevivência para quantidades de veneno menores.

O cálculo dos limites fiduciais para o valor de DL₅₀ foi realizado segundo as equações 34 e 35.

$$(34) V_{(m)} = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum [r(n-r)]$$

O limite fiducial de 95% para m é aproximadamente:

$$(35) m \pm t_{0,05} \sqrt{V_{(m)}}$$

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

2.1.2.- Análise imunológica

2.1.2.1.- Imunodifusão dupla radial

Método de Ouchterlony¹¹²

Esta metodologia foi utilizada para verificar, de forma qualitativa, a capacidade antigênica dos venenos nativo e irradiados frente ao soro antibotrópico.

Procedimento

Em lâminas de microscopia, previamente revestidas com 1 ml de agarose 1% em água destilada, foram distribuídos 4 ml de agarose 1% em salina. Após a manutenção das lâminas à 4°C, em câmara úmida por 12 horas, foram feitos 5 orifícios de 2mm de diâmetro nos géis, sendo o primeiro central e os demais dispostos isometricamente a uma distância de 1cm.

Foram aplicados 30 µl de soro antibotrópico, diluído 1:2 com salina, no poço central e 30 µl das amostras, na concentração de 2 mg/ml, nos poços circunvizinhos.

Após 24 horas em câmara úmida e à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com salina (15 vezes) e água destilada (15 vezes); secas à 42°C; coradas por 10 minutos em solução negro de amido 0,004% - ácido acético 10% e descoradas com ácido acético 5%.

2.1.2.2 - "Immunoblotting"

Método de Towbin & Gordon¹⁵³

A utilização dessa técnica teve como objetivo, complementar a análise da capacidade antigênica das amostras submetidas a diferentes doses de radiação gama; uma vez que permitiu a detecção da ligação antígeno-anticorpo entre frações proteicas, separadas eletroforéticamente, dos venenos nativo e irradiados e o soro antibotrópico.

Procedimento

A- EGPA-SDS

20 µg de venenos nativo e irradiados e 10 µg dos padrões de peso molecular conhecido (tabela IV) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% segundo a metodologia descrita no item 2.1.1.4.2. (página 30).

Duas placas foram corridas simultaneamente, sendo um gel utilizado como controle da separação eletroforética, corado com Coomassie e outro mantido em tampão de transferência (Tris 50 mM - glicina 380 mM - SDS 0,1% - metanol 20%) à 4°C, por 12 horas.

B- Eletrotransferência

A transferência das frações proteicas contidas no gel de poliacrilamida foi realizada em sistema úmido. O conjunto composto por: suporte de acrílico com polo positivo,

esponja, papel de filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose, papel de filtro, esponja e suporte de acrílico com polo negativo, embebido em tampão de transferência, foi colocado em cuba vertical preenchida com o mesmo tampão e a eletroforese processou-se em voltagem constante de 40V, variação de corrente de 150-180mA, sob refrigeração, por 5 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi corado, como descrito anteriormente, para certificação da transferência de todas as frações e a membrana de nitrocelulose incubada em tampão de bloqueio (Tris-HCl 50mM - NaCl 150mM - albumina de soro bovino (BSA) 2%(p/v); pH 7,4) por 12 horas, à 4°C.

C- Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após a incubação em tampão de bloqueio, a nitrocelulose foi lavada (4 x 5 minutos) com tampão TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM - NaCl 150 mM - Tween 20 0,1%; pH 7,4); incubada por 1 hora com soro antibotrópico diluído 1:100 em TBS-Tween; lavada como descrito anteriormente; incubada com soro anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em TBS-Tween; lavada novamente e revelada pela adição de 3,3'diaminobenzidina 0,05% - H₂O₂ 0,1% em TBS. A reação desenvolveu-se por 10 minutos sendo interrompida pela adição de água destilada. Toda técnica foi realizada à temperatura ambiente e sob agitação constante.

2.1.2.3.- Imunoprecipitação

Método de Kabat & Mayer⁷³ modificado

Esta metodologia foi utilizada para comparar, quantitativamente, a capacidade antigênica dos venenos nativo e irradiados.

Procedimento

Em 0,4 ml das amostras nas concentrações de 0,050; 0,0937; 0,1875; 0,25; 0,375; 0,625; 0,75; 0,875; 1 e 1,125 mg/ml foi adicionado 0,1 ml de soro antibotrópico, diluído 1:2 com salina. Após a incubação, por 1 hora, à 37°C e por 24 horas à 4°C, a mistura foi centrifugada por 10 minutos à 2000 rpm, em centrífuga refrigerada Sorval. O precipitado foi lavado com 2 ml de salina, por 3 vezes, ressuspenso em 1 ml de NaOH 0,1N e lido em 280 nm em espectrofotômetro Carl Zeiss. Os testes foram feitos em triplicata.

2.1.2.4.- Capacidade imunogênica

2.1.2.4.1.- Processo de imunização

A imunização de camundongos com venenos nativo e irradiados foi realizada para verificar se a radiação alterava a capacidade do veneno nativo induzir a formação de anticorpos.

Procedimento

Grupos de 16 camundongos machos (25-30 g) foram imunizados com venenos nativo e irradiados e um grupo controle com o diluente das amostras. Os animais foram inoculados pela via subcutânea, no dorso, em um volume de 0,1 ml, segundo o esquema de imunização descrito na tabela VI.

TABELA VI

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE
IMUNOGÊNICA DO VENENOS NATIVO E IRRADIADOS, EM CAMUNDONGOS

ÉPOCA DO INÓCULO (SEMANAS)	TIPO DE ADJUVANTE	QUANTIDADE INOCULADA VENENO (ug)
1ª	Freund Completo	10
3ª	Freund Incompleto	20
6ª	Freund Incompleto	20
8ª	Salina	40
10ª	Salina	80
12ª	Salina	150

Para comparar, *in vivo*, a capacidade neutralizante entre os anticorpos induzidos pelos venenos irradiados e nativo, considerando-se a letalidade; uma semana após a última etapa de imunização, todos os animais foram desafiados com 5 DL₅₀ de veneno nativo. A quantidade de veneno inoculada, pela via intraperitoneal, foi calculada segundo o peso de cada animal. A sobrevivência foi anotada 48 horas após o inóculo.

O sangue dos animais foi coletado, pelo plexo orbital, antes de cada imunização e 7 dias após o desafio. Os soros foram separados e mantidos à -20°C .

2.1.2.4.2.- Detecção de anticorpos

Método de Theakston e cols¹⁴⁹

O ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) foi utilizado para monitorar o título de anticorpos do soro dos animais, durante o processo de imunização e após ao desafio.

Procedimento

Placas plásticas (Hemobag) foram sensibilizadas com veneno nativo (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em tampão carbonato 0,05M; pH 9,6), 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ e mantidas à 4°C por 12 horas. Após a lavagem com salina-Tween 20 0,005% (4 x 5 minutos); 100 μl de soros de camundongos previamente imunizados, diluídos a partir de 1:500 em PBT (tampão fosfato salino 0,1M - BSA 1% - Tween 20 0,05%; pH 7,2) foram adicionados a cada poço; seguindo-se incubação por 1 hora; lavagem como descrito anteriormente e adição de soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em PBT, 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$. Após incubação por 1 hora, as placas foram novamente lavadas e a reação revelada pela adição de orto-fenilenediamina 0,04% em tampão citrato fosfato 0,15M; pH 5,0; 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$. A reação

desenvolveu-se por 10 minutos, sendo interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 4N a cada poço.

Toda técnica, com exceção da etapa de sensibilização das placas, foi realizada à temperatura ambiente.

A leitura dos poços foi feita em leitor automático de microplaca Multiskanplus, utilizando-se filtro em comprimento de onda de 492 nm.

2.1.2.5. - Neutralização de atividades biológicas

Método de Gutiérrez e cols⁵⁵

Esses experimentos foram realizados com o intuito de comparar, *in vivo*, a capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pelos venenos nativo e irradiados, considerando-se as atividades hemorrágica e edemaciante.

2.1.2.5.1. - Produção de antivenenos

Uma vez que, para realização dos experimentos de neutralização era necessária grande quantidade de soro imune, optamos pela imunização de animais de maior porte, utilizando para tanto, 18 coelhos machos com 1,9 a 2,0 Kg de peso.

Procedimento

Os animais, divididos em grupos de 3, foram imunizados com venenos nativo e irradiados com 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 Gy, segundo o esquema de imunização descrito na tabela VII.

TABELA VII

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE ANTIVENENOS NATIVO E IRRADIADOS, EM COELHOS

ÉPOCA (SEMANAS)	TIPO DE ADJUVANTE	I N Ó C U L O		
		VIA	LOCAL	QUANTIDADE VENENO(mg)
1ª	Freund Completo	intra- muscular	coxas	1,0
	Salina	subcutânea	6 pontos abdome	1,0
4ª a 8ª	Salina	subcutânea	6 pontos abdome	1,0

Para monitoração do título de anticorpos, a cada imunização o sangue dos animais foi coletado por veia auricular e o plasma analisado frente ao veneno de jararaca

não irradiado, pelo método de Ouchterlony (descrito no item 2.1.2.1.- página 39).

Uma semana após a última imunização foi feita sangria total dos animais, por punção cardíaca. O sangue foi coletado com citrato de sódio 3,8% (1 parte para 9 partes de sangue), centrifugado à 3000 rpm em centrífuga refrigerada Sorval e as amostras de plasma mantidas à -20°C .

2.1.2.5.2.- Precipitação da fração IgG por sulfato de amônio

Para obtenção dos anticorpos, a fração IgG das amostras de plasma (um "pool" para cada grupo de coelhos imunizados com a mesma amostra) foi precipitada com 40% de saturação de sulfato de amônio.

Procedimento

À 3 partes de plasma diluído com 2 partes de solução salina foram adicionadas, gota a gota, 5 partes de solução de sulfato de amônio a 80% de saturação, em banho de gelo e sob agitação constante. As misturas foram mantidas à 4°C por 24 horas e em seguida centrifugadas por 15 minutos à 4000 rpm, em centrífuga refrigerada Sorval.

Os sobrenadantes foram desprezados e uma segunda precipitação foi realizada com o intuito de melhorar a separação da fração IgG. Para tanto, os precipitados foram ressuspensos em 10 partes de solução de sulfato de amônio a

40% de saturação e as soluções centrifugadas como descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os precipitados ressuspensos em 0,5 partes de solução salina.

As soluções, contendo a fração IgG, foram dialisadas contra salina, sob refrigeração e agitação constante, até a total retirada do sulfato de amônio.

2.1.2.5.3 - Determinação da concentração proteica

A concentração proteica das soluções de IgG foi determinada segundo o item 2.1.1.1. (página 21), com o intuito de padronizar as concentrações nos experimentos de neutralização e comparar a capacidade imunogênica dos venenos nativo e irradiados.

2.1.2.5.4.- Neutralização de atividade hemorrágica

Com o intuito de avaliar a capacidade dos anticorpos neutralizarem a atividade hemorrágica do veneno nativo, foi determinada a dose efetiva 50% (DE₅₀), definida pela relação mg de IgG/mg de veneno capaz de neutralizar em 50% a atividade hemorrágica.

Procedimento

Para que o experimento de neutralização de atividade hemorrágica pudesse ser realizado, a dose mínima hemorrágica do veneno nativo (DMH= quantidade de veneno que induz uma lesão, cujo o produto das medidas transversal e longitudinal seja 100) foi estimada pela curva de atividade hemorrágica obtida no item 2.1.1.5.3. (página 34).

Cinco doses mínimas hemorrágicas de veneno nativo foram incubadas com diferentes concentrações de antiveneno, por 30 minutos à 37°C, de modo que as seguintes relações: 16,67; 8,33; 4,17; 2,08 e 1,04 mg IgG/ mg veneno fossem obtidas.

Após a neutralização *in vitro*, 100 µl da mistura, contendo 5 DMH de veneno e diferentes concentrações de antiveneno, foram inoculadas intradermicamente, no dorso previamente depilado, de camundongos fêmeas (25-30 g). Para a determinação da atividade hemorrágica de cada amostra foram utilizados 5 grupos de 6 animais, além de um grupo controle inoculado somente com 5 DMH de veneno. Após 1,5 horas os animais foram sacrificados, a pele removida e o diâmetro da lesão hemorrágica medido.

Tratamento dos dados

A hemorragia foi expressa em porcentagem, considerando-se como 100% a média dos produtos das medidas da lesão hemorrágica do grupo controle.

Os dados das curvas de porcentagem de atividade hemorrágica em função da relação mg IgG/mg veneno foram ajustados, por uma regressão linear, a uma equação do tipo:

$$(36) Y = AX + B$$

Onde: (Y) porcentagem de atividade hemorrágica;
(X) mg IgG/mg de veneno; (A) coeficiente angular da reta e
(B) coeficiente linear da reta.

Cálculo das doses efetivas 50%

A partir dessas curvas foi estimada DE₅₀ para cada amostra de antiveneno.

2.1.2.5.5.- Neutralização da atividade edemaciante

Para testar a capacidade de neutralização de atividade edemaciante dos anticorpos induzidos pelos venenos nativo e irradiados, o mesmo parâmetro descrito anteriormente (DE₅₀) foi utilizado. Este foi definido pela relação mg de IgG/ mg de veneno, necessária para neutralizar 50% da atividade edemaciante.

Segundo Gutiérrez e cols⁵⁵, nos experimentos de neutralização de atividade edemaciante, a pré-incubação do antiveneno e veneno não deve ser utilizada, pois este pode induzir a liberação de componentes farmacologicamente ativos do antiveneno, impedindo a neutralização e ocasionando o aumento da atividade.

Procedimento

Inicialmente, a dose mínima edemaciante do veneno nativo (DME= quantidade de veneno que, quatro horas após o inóculo, induz a 30% de edema) foi estimada pela curva de atividade edemaciante obtida no ítem 2.1.1.5.4. (página 35).

Para determinação da DE_{50} de cada amostra de IgG, 4 grupos de 6 camundongos machos (20-25g) foram inoculados, por via endovenosa, com 400, 200, 100 e 50 μ l de antiveneno. Cinco minutos depois, 5 doses mínimas edemaciantes foram inoculadas, em um volume de 50 μ l, pela via subplantar. Um grupo controle foi injetado somente com o veneno nativo.

O volume das patas foi medido antes do inóculo do antiveneno e 4 horas após o inóculo do veneno, por pletismografia.

Tratamento dos dados

A porcentagem de edema de cada grupo foi calculada pela equação 37:

$$(37) \text{ Edema (\%)} = \frac{V_f - V_i}{V_i} \times 100$$

Onde: (Vf) volume final da pata, 4 horas após o inóculo de veneno; (Vi) volume inicial da pata, antes do inóculo de antiveneno.

A porcentagem de atividade edemaciante da mistura antiveneno-veneno foi calculada, considerando-se como 100% o edema causado pelo grupo controle (inoculado somente com veneno). Os dados das curvas de porcentagem de atividade edemaciante em função da relação mg IgG/mg veneno foram ajustados, por uma regressão linear, a uma função:

$$(38) Y = AX + B$$

Onde: (Y) porcentagem de edema induzido pela mistura antiveneno-veneno; (X) mg IgG/ mg veneno; (A) coeficiente angular da reta e (B) coeficiente linear da reta.

A determinação dos parâmetros das retas e a estimativa das doses efetivas 50% foram realizadas como descrito no item anterior.

2.2.- Irradiação na presença de "scavengers"

Alíquotas de veneno de jararaca na concentração de 2 mg/ml em salina, contendo 0,1M; 0,5M; 1M; 1,5M e 2M de álcool butílico terciário ("scavenger" de radical hidroxila) e 0,001M; 0,005M; 0,01M; 0,05M e 0,1M de nitrato de sódio ("scavenger" de elétron hidratado), filtradas em membrana de nitrocelulose (poro de 0,22 μ) foram irradiadas na dose de 2000 Gy, em fonte de ^{60}Co , à temperatura ambiente e na presença de oxigênio.

Alíquotas de veneno nativo diluído em salina e contendo as diferentes concentrações dos compostos utilizados como "scavengers", além do veneno irradiado com 2000 Gy na ausência dos mesmos, foram utilizadas como referência nos ensaios. Todas as amostras, controles e irradiadas, foram liofilizadas, mantidas à -20°C e ressuspensas em água destilada no momento do uso. As amostras contendo nitrato de sódio foram previamente dialisadas contra solução salina.

Todas as metodologias descritas a seguir, utilizando amostras irradiadas na presença de "scavengers", foram realizadas com o intuito de estudar o mecanismo de ação da radiação gama, através da comparação dos resultados obtidos com o veneno nativo, irradiado na ausência de "scavengers" e na presença de diferentes concentrações dos mesmos.

2.2.1.- Concentração proteica

A concentração proteica das amostras foi obtida seguindo a mesma metodologia descrita no item 2.1.1.1 (página 21).

2.2.2- Espectro de absorção na região ultravioleta

As amostras foram analisadas, na região de 235 a 320 nm, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$ em salina, em espectrofotômetro Hitashi, modelo U-3200, com registro automático de vários comprimentos de onda.

As densidades ópticas foram obtidas utilizando como branco a solução solvente.

2.2.3.- Cromatografia em TSK G 3000 (HPLC)

Esta metodologia foi utilizada em substituição a cromatografia em Sephacryl S-200, na tentativa de otimizar a separação das frações proteicas das amostras irradiadas com 2000 Gy.

Procedimento

A análise cromatográfica foi realizada em coluna de 60 x 0,75 cm, TSK G-3000-SW, cujo limite de fracionamento é de 1 a 300 KDa, acoplada a um equipamento Shimatzu C-R6A, que consta de dois sistemas automáticos de bombeamento, uma bomba injetora, um microcomputador, um detector espectrofotométrico e um registrador.

Inicialmente todas as soluções utilizadas na cromatografia foram filtradas em membranas de nitrocelulose (poro de 0,22 μ) e deaeradas. A coluna, após lavagem com metanol, foi equilibrada com tampão fosfato 50mM - NaCl 250mM, pH 7,4.

As amostras, na concentração de 2 mg/ml em salina, foram aplicadas em um volume de 20 μ l e a cromatografia processou-se em pressão constante de 180 Kgf/cm² e fluxo de 1 ml/minuto, à temperatura ambiente.

A densidade óptica das frações em 280 nm e o perfil cromatográfico, foram determinados automaticamente pelo detector e registrador acoplados à coluna.

2.2.4.- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, na ausência e presença de agentes redutores.

As técnicas foram realizadas como descrito no item 2.1.1.4 (página 25), utilizando-se somente a coloração com nitrato de prata.

2.2.5.- Atividades enzimáticas e biológicas

2.2.5.1.- Atividade proteolítica

A atividade proteolítica, tipo caseinolítica, das amostras foi determinada conforme descrito no item 2.1.2.5.1. (página 30), utilizando-se a concentração de 250 µg de proteína/ml.

2.2.5.2.- Atividade coagulante

A atividade coagulante das amostras foi determinada como descrito no item 2.1.1.5.2. (página 31), utilizando-se a concentração de 250 µg proteína/ml. A atividade coagulante específica foi determinada segundo a equação 39:

$$(39) \text{ Atividade coagulante em U/mg} = \frac{\text{I.C.}}{\text{mg veneno}} \times 0,1$$

Onde: (I.C) índice coagulante, calculado pela relação 1000/tempo de coagulação.

2.2.5.3.- Atividade hemorrágica

A determinação de atividade hemorrágica das amostras foi realizada conforme o item 2.1.1.5.3. (página 34), inoculando-se os animais com 30 µg das amostras de veneno.

2.2.5.4.- Atividade edemaciante

A atividade edemaciante das amostras foi determinada segundo o item 2.1.1.5.4. (página 35), inoculando-se as patas posteriores dos animais com 3 µg das amostras de veneno.

2.2.5.5. Cálculo do percentual de radioproteção

A porcentagem de radioproteção das atividades proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante, conferidas pela adição de diferentes concentrações dos compostos utilizados como "scavengers", foi calculada a partir da unidade percentual de radioproteção (U.P.R.), obtida tomando-se como referência as atividades específicas das amostras nativa (A' nat) e irradiada com 2000 Gy (A 2000), segundo a equação 40:

$$(40) \text{ U.P.R.} = \frac{A_{\text{nat}} - A_{2000}}{100}$$

A porcentagem de radioproteção conferida pelas diferentes concentrações dos compostos utilizados, foi obtida pela equação 41:

$$(41) \% \text{ radioproteção} = \frac{A_{\text{sc}} - A_{2000}}{\text{U.P.R.}}$$

Onde: (A sc) atividade específica das amostras irradiadas na presença de "scavengers".

2.3.- Análise estatística

Os valores de "A", "B", seus respectivos desvios e o coeficiente de correlação linear (r) das curvas padrão de albumina, calibração de peso molecular da coluna de Sephacryl e das atividades proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante das amostras foram determinados pelo método dos mínimos quadrados do programa SAS¹²¹, implantado no Depto de Processamento de Dados do IPEN.

A existência das regressões lineares foi testada pela análise de variância devido à regressão, residual amostral e total, determinando-se o valor de F (valor de variância) e o nível de significância no qual F é maior que F crítico.

O teste t-Student foi aplicado para comprovar a significância entre as diferenças observadas nas atividades enzimáticas e biológicas das amostras irradiadas com a dose de 2000 Gy na presença de "scavengers", em relação as amostras controle e entre os resultados obtidos nas dosagens proteicas.

VI- RESULTADOS

1.- Irradiação em diferentes doses

1.1.- Análise bioquímica e biológica

1.1.1.- Concentração proteica

Os teores proteicos das amostras foram estimados a partir de uma curva padrão de albumina bovina, cujos parâmetros e seus respectivos desvios foram: $A = 0,0033 \pm 0,0000$; $B = 0,0129 \pm 0,0025$; $r = 0,9967$. A análise de variância aplicada à regressão linear dessa curva indicou a existência da regressão a nível de significância de 0,1%.

A tabela VIII mostra as concentrações, teores proteicos e respectivos desvios, estimados a partir da curva padrão de albumina bovina, evidenciando a manutenção da concentração das amostras submetidas às doses de radiação utilizadas. O conteúdo proteico das alíquotas de veneno nativo, incubadas à temperatura ambiente durante o período de irradiação de cada amostra, também foram iguais ao da amostra nativa.

TABELA VIII

CONCENTRAÇÃO PROTEICA DE VENENOS DE JARARACA NATIVO
E SUBMETIDO À DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO

AMOSTRAS	Concentração (mg/ml)	ug PROTEÍNA/ mg VENENO
NATIVA	1879±10 *	939±5
500 Gy	1872±12 *	936±6
1000 Gy	1902±18 *	951±9
2000 Gy	1872±14 *	936±7
3000 Gy	1925±12 *	962±6
4000 Gy	1895±10 *	947±5

* Diferenças não significativas segundo teste
t-Student (nível de significância de 5%)

1.1.2.- Espectro de absorção em ultravioleta

Os controles de temperatura de irradiação mostraram absorção idêntica à amostra nativa, enquanto as irradiadas apresentaram aumento do coeficiente de extinção molar, proporcionalmente ao aumento da dose de radiação, na faixa de 235 a 330 nm (figura 1).

O gráfico inserido na figura, mostra a diferença da absorção mínima a 249 nm, entre o veneno nativo e os irradiados.

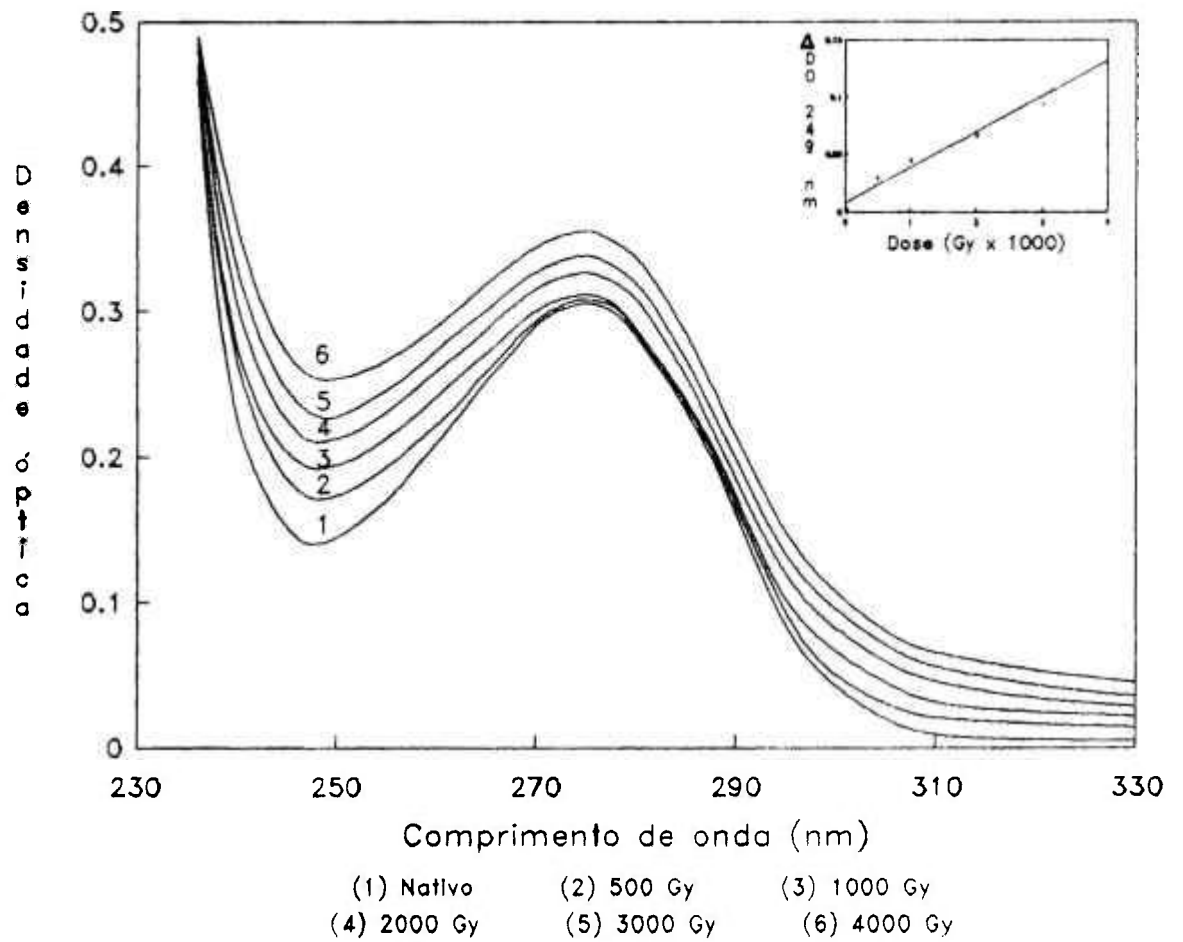


Figura 1: Espectro de absorção na região ultravioleta, de venenos de jararaca nativo e irradiados, na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sendo as leituras realizadas contra solução salina.

1.1.3.- Cromatogramas em Sephacryl S-200

O perfil cromatográfico do veneno de jararaca nativo (figura 2) foi semelhante ao obtido por Denson e Rousseau³¹, evidenciando a presença de 6 frações.

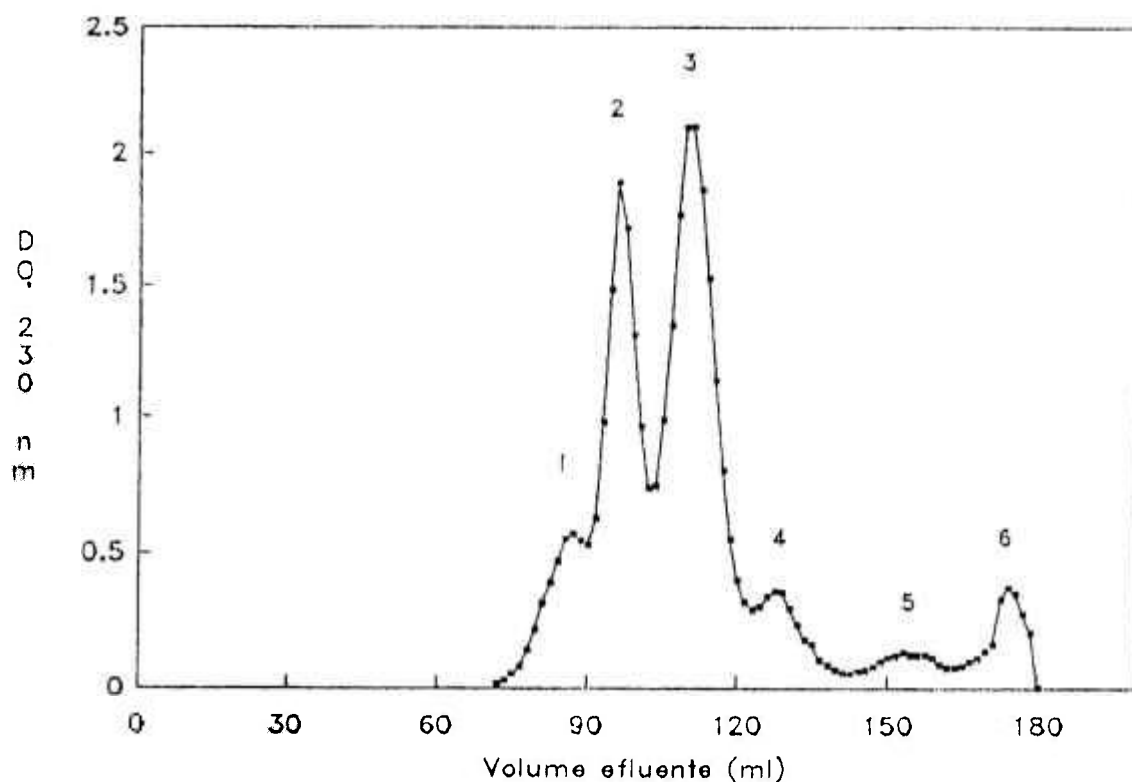


Figura 2: Cromatograma de veneno de jararaca nativo em Sephacryl S-200.

Os perfis cromatográficos em Sephacryl S-200, das amostras irradiadas comparadas com a amostra nativa, são mostrados nas figuras 3 a 7.

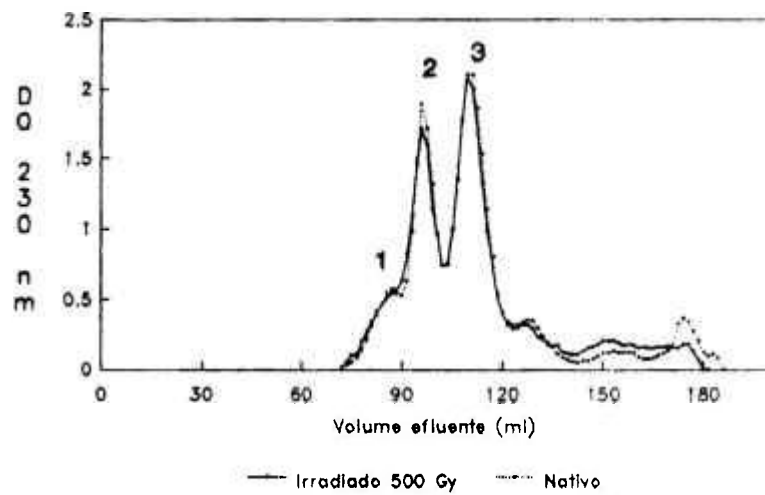


Figura 3: Cromatogramas de venenos de jararaca nativo e irradiado com 500 Gy.

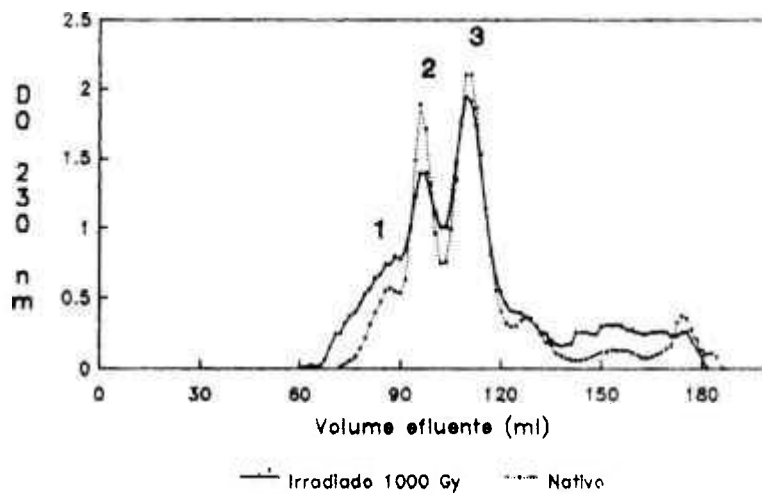


Figura 4: Cromatogramas de venenos de jararaca nativo e irradiado com 1000 Gy.

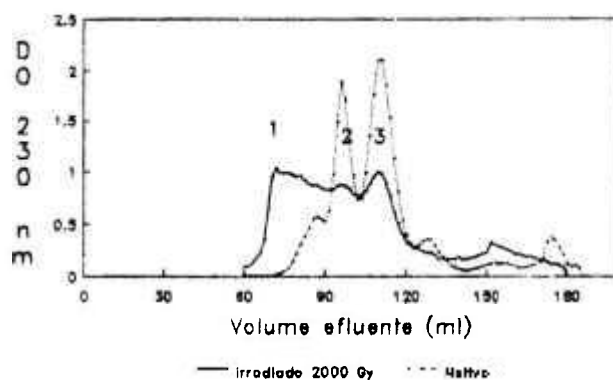


Figura 5: Cromatogramas de venenos de jararaca nativo e irradiado com 2000 Gy.

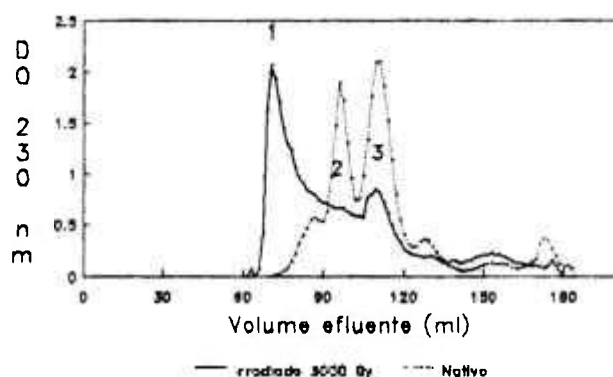


Figura 6: Cromatogramas de venenos de jararaca nativo e irradiado com 3000 Gy.

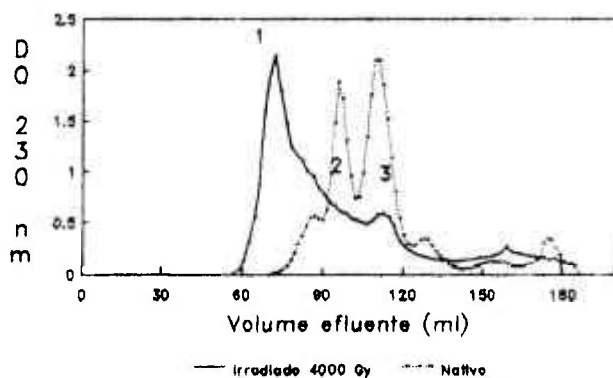


Figura 7: Cromatogramas de venenos de jararaca nativo e irradiado com 4000 Gy.

Cromatografias em Sephacryl S-200, em coluna de 1,5x90 cm, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM- NaCl 80 mM, pH 7,5, em fluxo contínuo de 12 ml/hora.

Os cromatogramas das alíquotas de veneno nativo incubadas à temperatura ambiente, durante o período de irradiação de cada amostra, foram idênticos ao da amostra não irradiada.

Pela cromatografia dos padrões de peso molecular conhecido (tabela II, página 23), foi construída a curva de calibração de peso molecular da coluna de Sephacryl, cujos parâmetros e seus respectivos desvios foram: $A = 2,2367 \pm 0,2644$; $B = -0,1766 \pm 0,0247$ e $r = 0,9260$. O tratamento estatístico aplicado para comprovar a existência da regressão linear indicou nível de significância de 0,56% para a mesma.

Com o intuito de analisar, de forma quantitativa, as alterações promovidas pela radiação no veneno de jararaca, foram calculadas as áreas das principais frações, obtidas por cromatografia (picos 1, 2 e 3). Pela observação da figura 8 notamos que a área dos picos da amostra irradiada com 500 Gy não foi alterada significativamente, enquanto na amostra irradiada com 1000 Gy observou-se um aumento de 107% da fração "1", em relação à mesma da amostra nativa. Por outro lado, nas doses de 2000, 3000 e 4000 Gy a área da fração "1" apresentou um aumento de 338%, 418% e 567%, respectivamente, proporcional à diminuição das demais frações ("2" e "3").

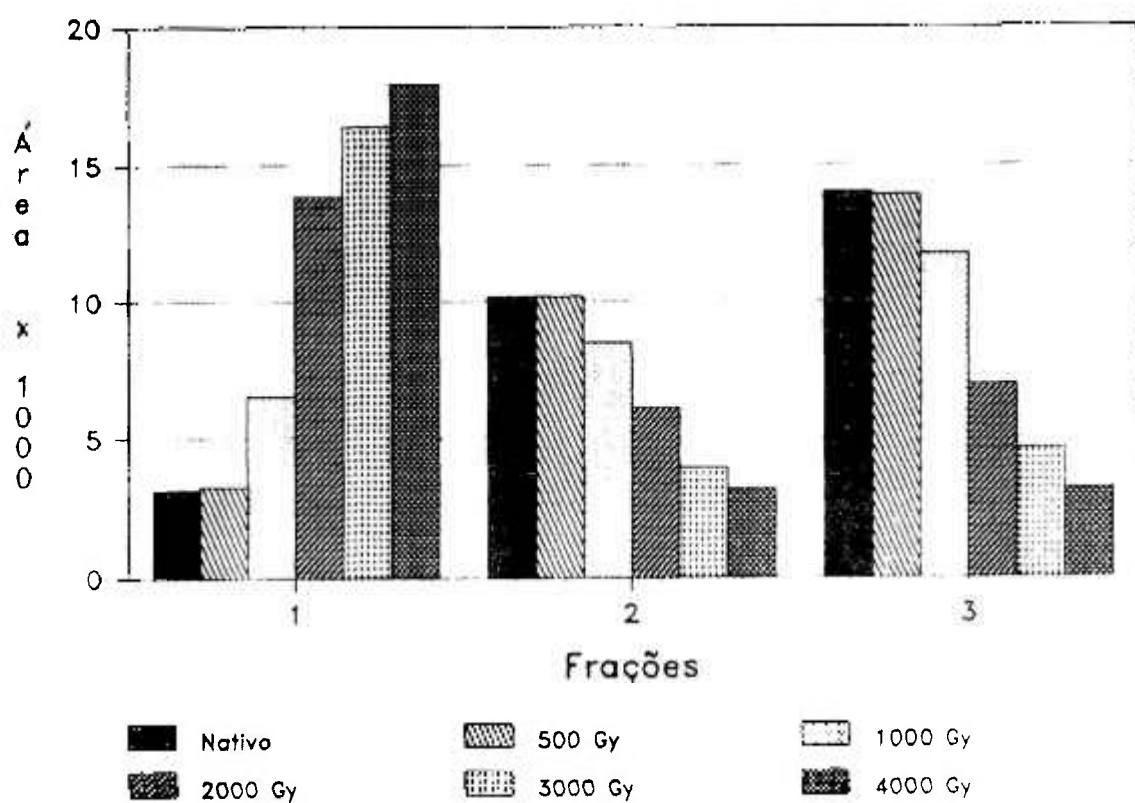


Figura 8: Área das principais frações dos venenos de jararaca nativo e irradiados, separadas por cromatografia em Sephacryl S-200, estimadas pelo programa "Analysis".

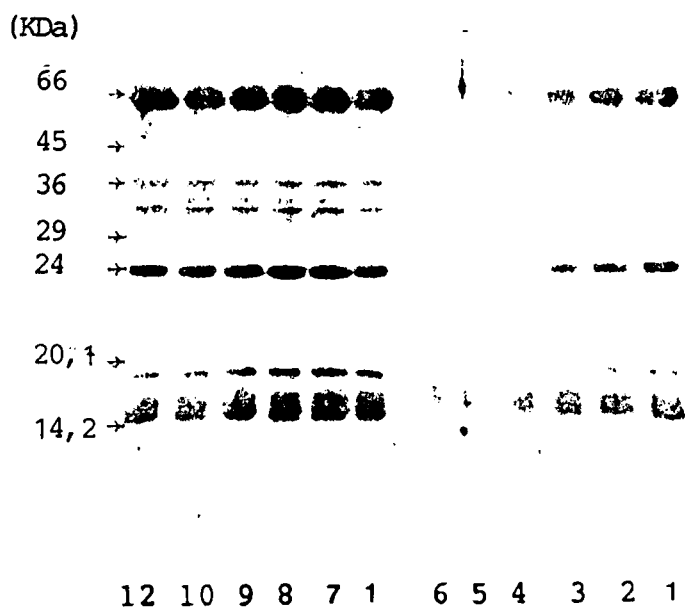
1.1.4.- Perfis eletroforéticos em EGPA-SDS

1.1.4.1.- EGPA-SDS na presença de agentes redutores

Os perfis eletroforéticos das amostras mostraram difusão crescente das proteínas no gel, à medida que a dose de radiação aumentou e confirmaram, em parte, os resultados obtidos nas cromatografias, pois além das alterações descritas nas mesmas, evidenciaram frações de peso molecular menor que as reveladas na amostra nativa.

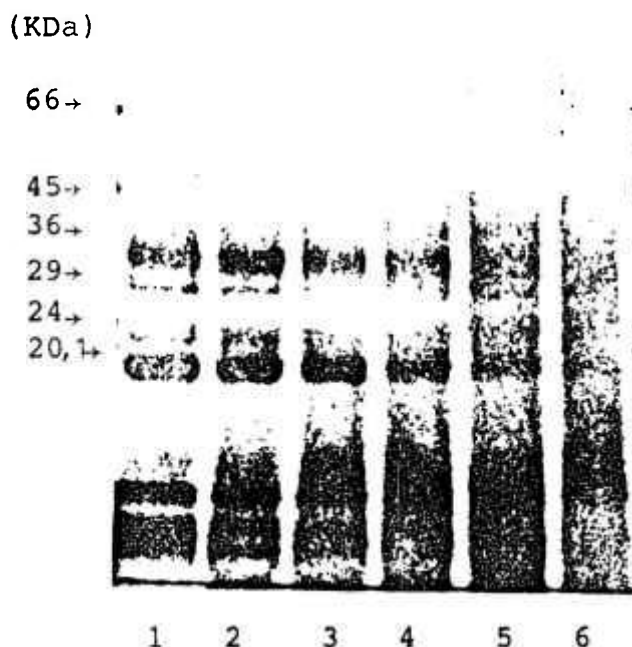
Essas alterações foram observadas tanto pelo método de coloração com Coomassie (figura 9) quanto pelo método com nitrato de prata (figura 10).

Os perfis eletroforéticos das alíquotas de veneno nativo, controles de temperatura de irradiação, foram idênticos à amostra não irradiada.



(1) NATIVO (2) 500 Gy (3) 1000 Gy (4) 2000 Gy
 (5) 3000 Gy (6) 4000 Gy (7) CONTROLE 500 Gy
 (8) CONTROLE 1000 Gy (9) CONTROLE 2000 Gy
 (10) CONTROLE 3000 Gy (11) CONTROLE 4000 Gy

FIGURA 9: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12,5% COM SDS, DE VENENOS NATIVO, CONTROLE E EXPOSTOS À TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE O PERÍODO DE IRRADIAÇÃO DE CADA AMOSTRA E IRRADIADOS, CORADA COM COOMASSIE. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS COM URÉIA, 2-MERCAPTOETANOL E SDS.



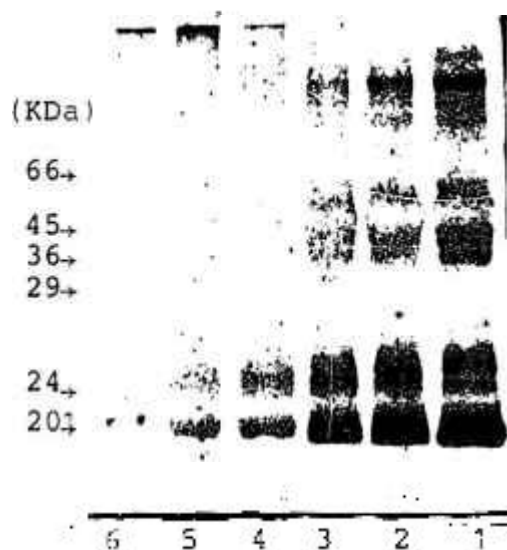
(1) Nativo (2) 500 Gy (3) 1000 Gy
 (4) 2000 Gy (5) 3000 Gy (6) 4000 Gy

FIGURA 10: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12,5% COM SDS, DE VENENOS NATIVO E IRRADIADOS, CORADA COM NITRATO DE PRATA. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS COM URÉIA, 2-MERCAPTOETANOL E SDS.

Os perfis eletroforéticos das amostras, representados nas figuras 10 e 11, mostram que as proteínas têm afinidades diferentes pelos corantes utilizados e o método que utiliza nitrato de prata evidencia um maior número de frações proteicas do que o que utiliza Coomassie como corante. Os resultados sugerem que a radiação altera a afinidade pelos corantes, uma vez que menor intensidade de coloração foi detectada nas amostras irradiadas..

1.1.4.2.- EGPA-SDS na ausência de agentes redutores

A eletroforese na ausência de agentes redutores não evidenciou a presença de proteínas de baixo peso molecular nas amostras irradiadas (figura 11), concordando com os resultados obtidos nas cromatografias.



(1) NATIVO (2) 500 Gy (3) 1000 Gy
(4) 2000 Gy (5) 3000 Gy (6) 4000 Gy

FIGURA 11: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10%, COM SDS, DE VENENOS NATIVO E IRRADIADOS, CORADA COM NITRATO DE PRATA. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS COM SDS.

1.1.5.- Atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas

1.1.5.1.- Atividades enzimáticas e biológicas

As curvas das atividades proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante, em relação à concentração de veneno, indicam a atenuação de todas as atividades à medida que a dose de radiação aumenta. As curvas teóricas, obtidas por regressão linear dos dados experimentais, são mostradas nas figuras 12, 13, 14 e 15, respectivamente, sendo as amostras identificadas pela seguinte numeração:

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| (1) AMOSTRA NATIVA | (2) IRRADIADA COM 500 Gy |
| (3) IRRADIADA COM 1000 Gy | (4) IRRADIADA COM 2000 Gy |
| (5) IRRADIADA COM 3000 Gy | (6) IRRADIADA COM 4000 Gy |

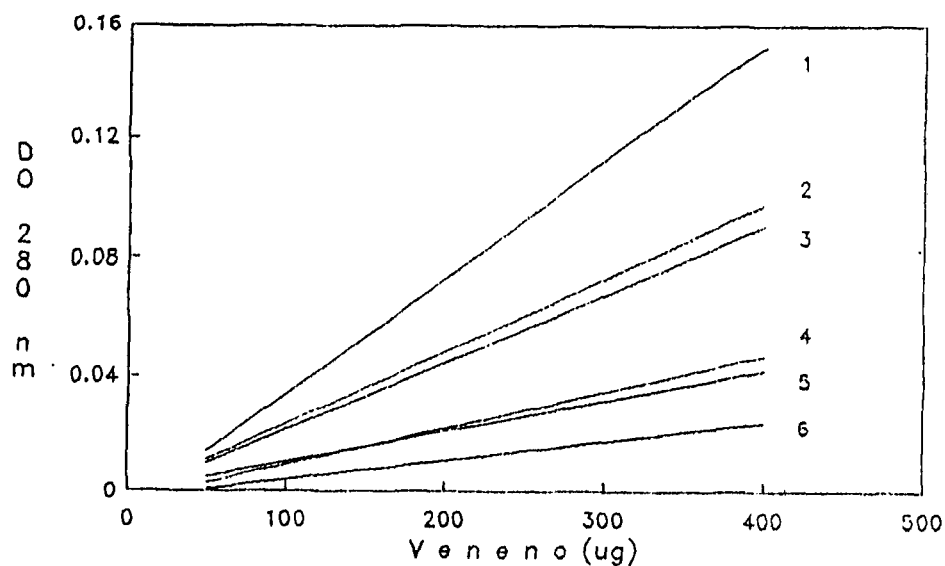


Figura 12: Atividade proteolítica tipo caseinolítica de venenos de jararaca nativo e irradiados.

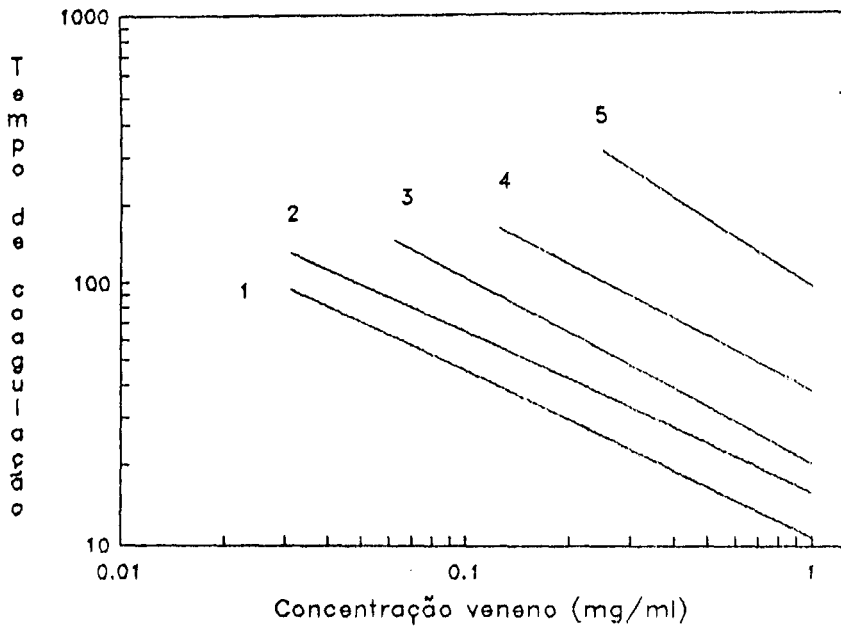


Figura 13: Atividade coagulante, sobre plasma humano citratado, de venenos de jararaca nativo e irradiados.

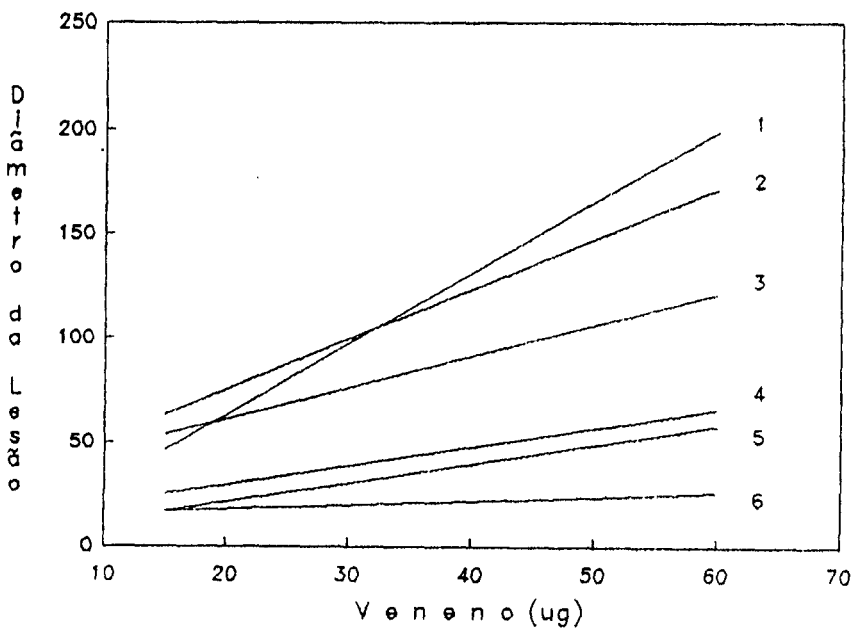


Figura 14: Atividade hemorrágica de venenos de jararaca nativo e irradiados, em camundongos.

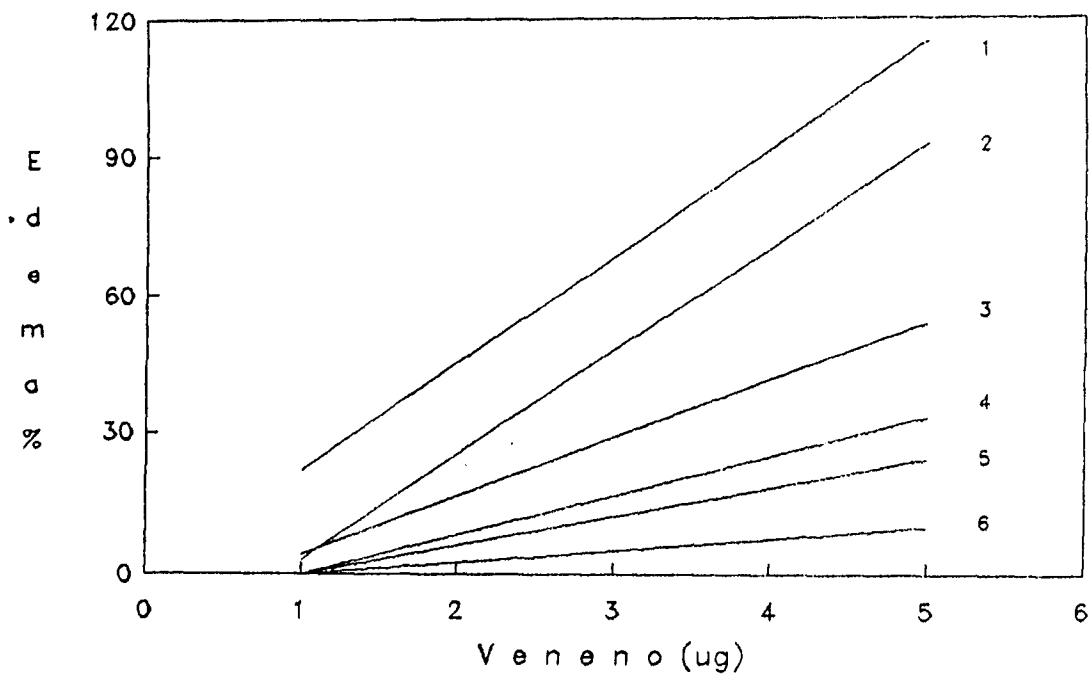


Figura 15: Atividade edemaciante de venenos de jararaca nativo e irradiados, em camundongos.

TABELA IX

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, TIPO CASEINOLÍTICA, DE VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS

AMOSTRAS	DENSIDADE ÓPTICA						ATIVIDADE			
	MICROGRAMAS						A	B	ESPEC. RELATIVA	
	50	100	150	200	300	400	r	U/mg	%	
NATIVA	0,0147 ±0,0021	0,0353 ±0,0058	0,0473 ±0,0029	0,0737 ±0,0008	0,117 ±0,0025	0,15 ±0	0,0004 ±0	-0,0061 ±0,002	34,93 ±3,72	100,0 ±10,6
								0,9919		
500 Gy	0,015 ±0,001	0,029 ±0,0026	0,0393 ±0,0023	0,0545 ±0,0045	0,0793 ±0,0023	0,1 ±0,002	0,0002 ±0	0,0018 ±0,001	26,48 ±2,07	75,8 ±2,7
								0,9990		
1000 Gy	0,0143 ±0,0032	0,028 ±0,084	0,0317 ±0,0047	0,05 ±0,0035	0,0687 ±0,0046	0,097 ±0,003	0,0002 ±0	0,0018 ±0,0021	23,31 ±5,78	66,7 ±6,5
								0,9748		
2000 Gy	0,0887 ±0,0012	0,0173 ±0,0061	0,022 ±0,0035	0,0257 ±0,0025	0,0393 ±0,0042	0,0054 ±0	0,0001 ±0	0,0029 ±0,0016	14,8 ±2,07	42,4 ±5,9
								0,9532		
3000 Gy	0,006 ±0	0,011 ±0,001	0,0147 ±0,0085	0,0207 ±0,0012	0,0287 ±0,0012	0,044 ±0	0,0001 ±0	0,0002 ±0,0009	10,62 ±0,9	30,4 ±2,6
								0,9772		
4000 Gy	0,0047 ±0,0015	0,0113 ±0,0023	0,0147 ±0,0023	0,0193 ±0,0012	0,0247 ±0,0023	0,03 ±0	0 ±0	0,0036 ±0,001	9,6 ±1,6	27,5 ±4,6
								0,9385		

TABELA X

ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS, EM CAMUNDONGOS

AMOSTRAS	PRODUTO DAS MEDIDAS DA LESÃO				A	B	ATIVIDADE		
	MICROGRAMAS						r	ESPECÍFICA	RELATIVA
	15	30	45	60					
NATIVA	43,2 ±9,0	100,0 ±23,0	152,5 ±20,69	195,0 ±11,6	3,3850 ±0,243	-4,2500 ±9,997	31,66 ±3,2	100,0 ±10,1	
					0,9277				
500 Gy	58,5 ±17,2	105,2 ±12,6	139,23 ±2,2	163,0 ±21,9	2,3767 ±0,226	28,125 ±9,282	33,17 ±4,9	104,8 ±15,5	
					0,8796				
1000 Gy	27,0 ±6,3	79,5 ±7,4	101,2 ±10,0	118,0 ±28,9	1,49 ±0,234	31,5 ±9,612	25,62 ±6,1	80,9 ±19,4	
					0,7250				
2000 Gy	27,77 ±7,6	34,5 ±1,7	54,2 ±3,5	66,2 ±4,0	0,9017 ±0,078	11,875 ±3,194	13,27 ±3,5	41,9 ±11,1	
					0,8990				
3000 Gy	16,7 ±2,2	30,7 ±3,0	31,5 ±18,6	58,5 ±11,0	0,9233 ±0,11	2,8750 ±4,528	10,24 ±0,6	32,3 ±2,1	
					0,8218				
4000 Gy	0	6,6 ±2,3	17,7 ±1,7	26,2 ±4,8	0,6033 ±0,043	-10,125 ±1,762	3,43 ±1,26	10,8 ±4,0	
					0,9292				

TABELA XII

ÍNDICE COAGULANTE (IC) DE VENENOS NATIVO E IRRADIADOS,
CALCULADO SEGUNDO EQUAÇÃO: IC= 1000/TEMPO DE COAGULAÇÃO

AMOSTRA	ÍNDICE COAGULANTE					
	CONCENTRAÇÃO (mg/ml)					
	1,000	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031
NATIVA	89,60	59,27	41,67	26,60	15,37	10,49
500 Gy	58,65	41,72	28,84	19,19	11,67	7,21
1000 Gy	45,65	39,86	20,05	12,08	6,18	*
2000 Gy	25,44	16,79	10,02	5,91	*	*
3000 Gy	10,47	5,56	3,24	*	*	*
4000 Gy	*	*	*	*	*	*

* INCOAGULÁVEL

TABELA XIII

ATIVIDADE COAGULANTE DE VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS, SOBRE PLASMA HUMANO

AMOSTRAS	TEMPO DE COAGULAÇÃO (SEGUNDOS)						A	B	ATIVIDADE RELATIVA %
	CONCENTRAÇÃO (mg/ml)								
	1,000	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031	r		
NATIVA	11,2	16,9	24,0	37,6	65,1	95,3	-0,6240	0,0106	100,0
	±0,7	±0,6	±1,3	±0,3	±2,4	±1,5	±2,3833	±0,0223	
							0,9934		
500 Gy	17,1	23,0	34,7	52,1	86,0	138,6	-0,6054	0,0103	70,3
	±0,3	±1,0	±0,5	±0,6	±1,5	±2,6	±2,7683	±0,0216	±3,4
							0,9984		
1000 Gy	22,1	32,4	49,9	82,8	161,9	*	-0,7104	0,0214	47,3
	±1,8	±1,3	±0,7	±2,7	±4,3		±3,0114	±0,0364	±4,7
							0,9830		
2000 Gy	39,3	59,6	99,8	169,2	*	*	0,7065	0,0114	25,7
	±0,9	±1,0	±1,5	±1,8			±3,6385	±0,0148	±3,1
							0,9961		
3000 Gy	99,5	179,9	*	*	*	*	-	-	9,6
	±1,4	±7,8							±2,0
4000 Gy	*	*	*	*	*	*	-	-	0,0

* INCOAGULÁVEL

As alíquotas de veneno nativo, incubadas à temperatura ambiente durante o período de irradiação de cada amostra, não apresentaram diferenças significativas nas atividades testadas, em relação à amostra nativa.

1.1.5.2.- Toxicidade

Os valores de DL₅₀, em mg de veneno seco/Kg de peso, com os seus respectivos limites fiduciais, estão representadas na tabela XIV, indicando a atenuação da toxicidade à medida que a dose de radiação aumenta.

TABELA XIV
DOSE LETAL 50% DE VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS,
INOCULADOS POR VIA INTRAPERITONEAL (0.5 ml), EM CAMUNDONGOS MACHOS DE 20-22g

AMOSTRAS	DOSE EM MICROGRAMAS/ MORTALIDADE							DL ₅₀	TOXICIDADE
								mg/Kg	RELATIVA(%)
NATIVA	dose(ug)	27,0	40,5	60,7	91,1	136,7	205,0	1,94	100,0
	mort(%)	0	80,0	100,0	80,0	100,0	100,0	(1,52-2,48)	
500 Gy	dose(ug)	27,0	40,5	60,7	91,1	136,7	205,0	3,16	61,4
	mort(%)	0	20,0	20,0	100,0	100,0	100,0	(2,44-4,1)	
1000 Gy	dose(ug)	60,7	91,1	136,7	205,0	307,5	461,2	9,08	21,4
	mort(%)	0	0	40,0	60,0	80,0	100,0	(6,42-12,84)	
2000 Gy	dose(ug)	91,2	136,7	205,0	307,5	460,0	690,0	12,55	15,5
	mort(%)	0	0	20,0	100,0	80,0	100,0	(9,82-16,04)	
3000 Gy	dose(ug)	136,5	205,0	307,0	460,0	688,0	1032,0	20,93	9,3
	mort(%)	0	0	20,0	80,0	80,0	100,0	(15,13-27,6)	
4000 Gy	dose(ug)	460,0	507,0	760,0	1140,0	1708,0	2500,0	36,49	5,3
	mort(%)	0	0	80,0	80,0	100,0	100,0	(28-47,56)	

As curvas de atividade relativa das amostras, em função da dose de radiação, são mostradas na figura 16. Os resultados indicam diferenças no grau de radiosensibilidade, apresentando em ordem crescente as atividades coagulante, tóxica, edemaciante, hemorrágica e proteolítica.

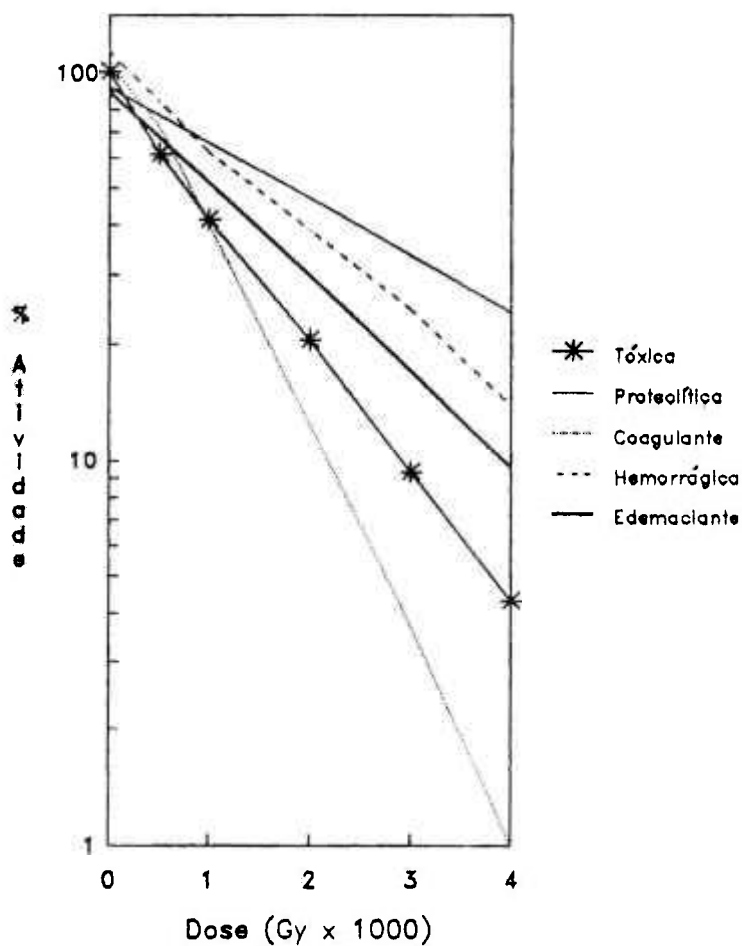
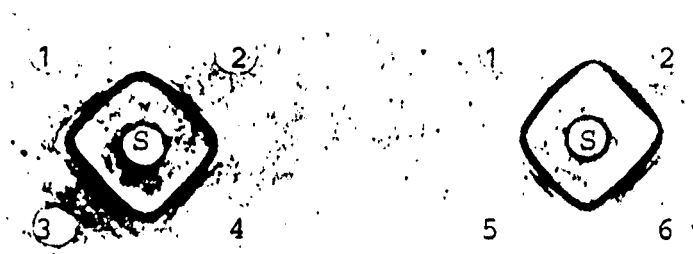


Figura 16: Efeito da radiação gama nas atividades tóxica, proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante do veneno de jararaca. As curvas foram obtidas por regressão linear dos dados experimentais.

1.2.- Análise imunológica

1.2.1.- Imunodifusão dupla radial

A figura 17 mostra a semelhança entre as linhas de precipitação das amostras nativa e irradiadas, contra o soro antibotrópico.



(1) NATIVO (2) 500 Gy (3) 1000 Gy (4) 2000 Gy
(5) 3000 Gy (6) 4000 Gy (S) SORO ANTIBOTRÓPICO

FIGURA 17: IMUNODIFUSÃO DUPLA RADIAL DE VENENOS NATIVO E IRRADIADOS, EM GEL DE AGAROSE 1%, AS AMOSTRAS, NA CONCENTRAÇÃO DE 2 mg/ml, FORAM ANALISADAS FRENTE AO SORO ANTIBOTRÓPICO.

1.2.2.- "Immunoblotting"

A comparação entre os perfis eletroforéticos das amostras em EGPA-SDS (figura 9) e os perfis revelados por "immunoblotting" (figura 18), indica que todas as frações separadas eletroforeticamente, tanto da amostra nativa quanto das amostras irradiadas, reagiram com os anticorpos do soro antibotrópico.

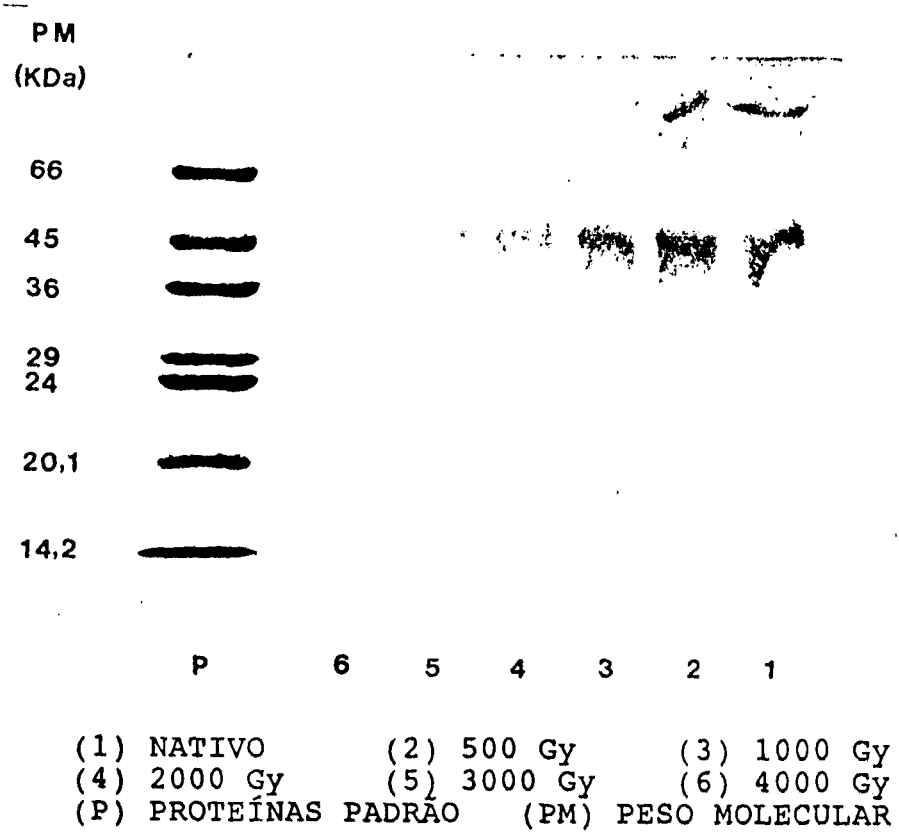


FIGURA 18: VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS, FRACIONADOS POR EGPA-SDS E REVELADOS POR "IMMUNOBLOTTING" COM SORO ANTIBOTRÓPICO.

1.2.3.- Imunoprecipitação

A figura 19 refere-se às porções ascendentes das curvas de imunoprecipitação, construídas a partir da quantidade de veneno em função da ligação antígeno-anticorpo, representada pela densidade óptica.

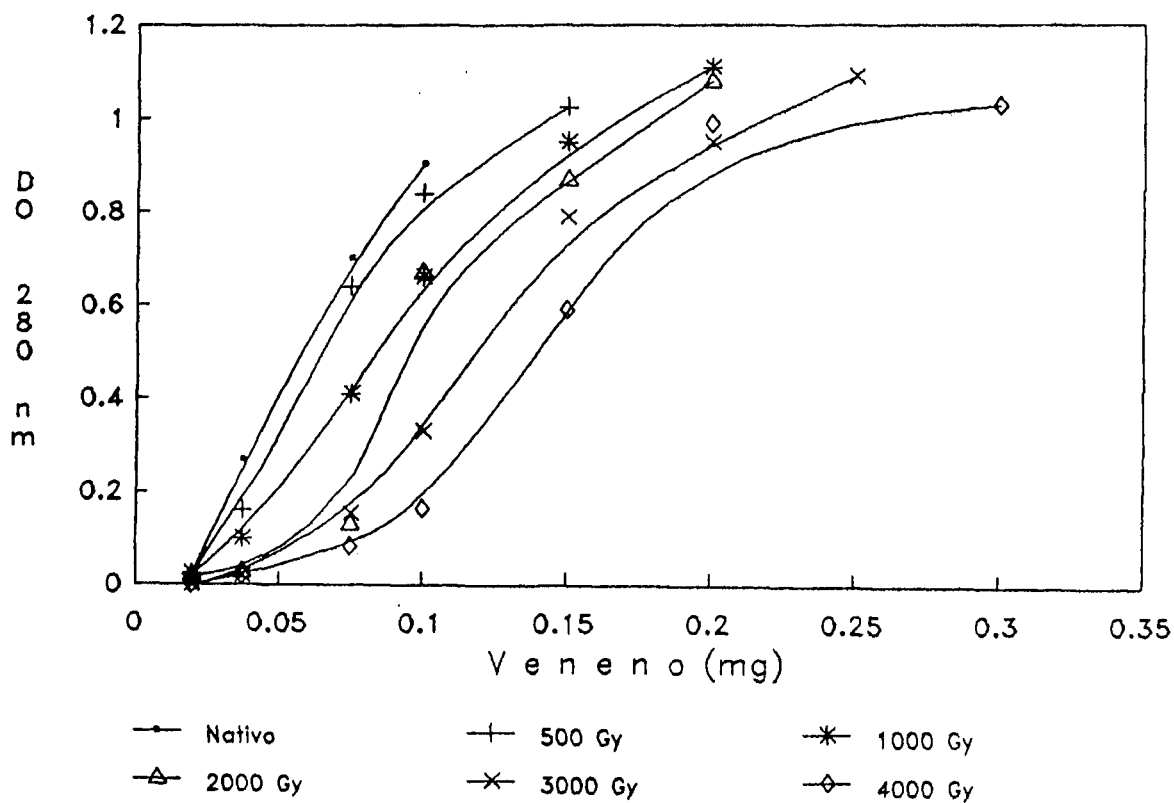


Figura 19: Comparação entre as porções ascendentes das curvas de imunoprecipitação, dos venenos nativo e irradiados, contra soro antibotrópico.

Esses resultados sugerem que a capacidade antigênica da amostra irradiada com 500 Gy não foi alterada e que embora os venenos irradiados com maiores doses possuam a capacidade de ligar-se aos anticorpos, existem modificações na interação antígeno-anticorpo, uma vez que foram necessárias maiores quantidades de antígeno irradiado para que a mesma ligação antígeno nativo-anticorpo fosse obtida.

Por outro lado, notamos que a densidade óptica do último ponto da porção ascendente das curvas é maior nas amostras irradiadas do que na amostra nativa.

1.2.4.- Capacidade imunogênica

A figura 20 indica a semelhança entre o título de anticorpos do soro de camundongos imunizados com venenos nativo e irradiados. As diferenças observadas, representam somente uma diluição na metodologia de ELISA, não sendo estatisticamente significantes.

A sobrevida dos animais imunizados após desafio com cinco DL₅₀ de veneno nativo é mostrada na mesma figura, ao final da última semana de coleta. Maior sobrevida foi observada nos animais imunizados com venenos irradiados com 500, 1000 e 2000 Gy em relação ao grupo imunizado com veneno nativo. Por outro lado, os animais imunizados com 3000 e 4000 Gy parecem não ser protegidos contra os efeitos letais do veneno de jararaca nativo.

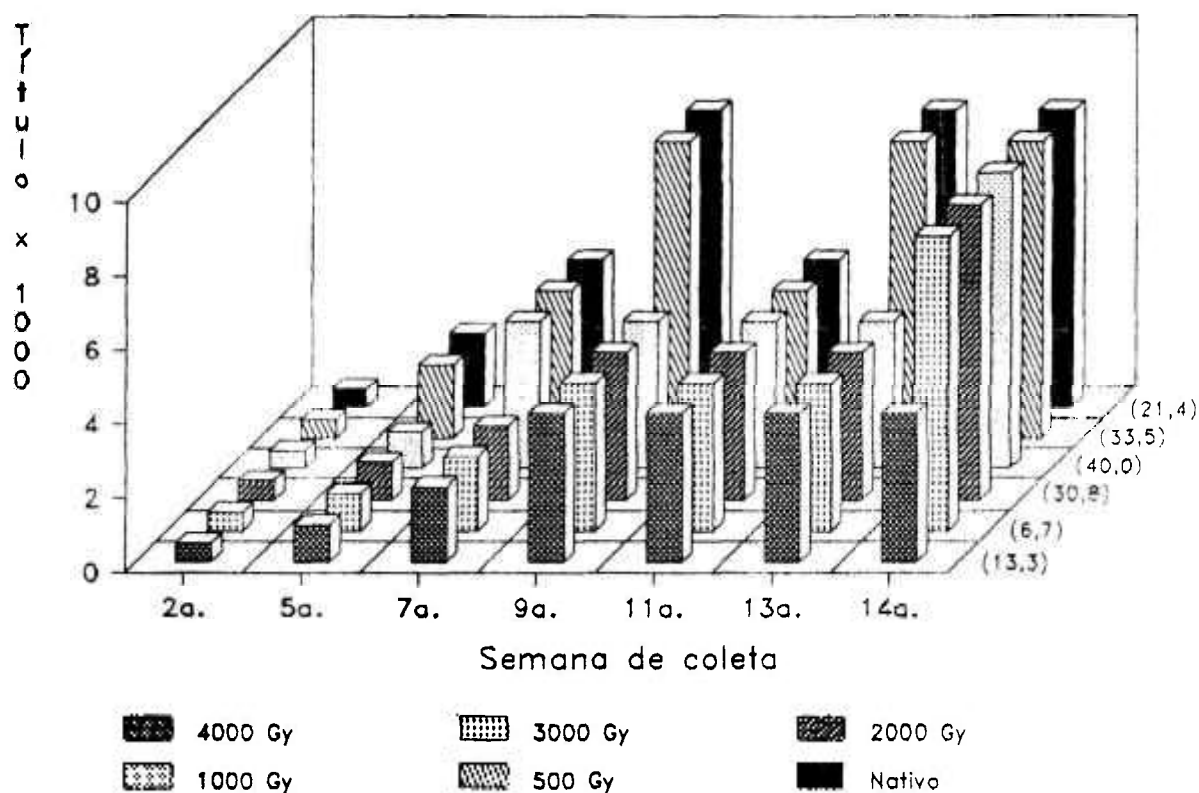


Figura 20: Títulos de anticorpos obtidos no soro de camundongos imunizados com venenos de jararaca nativo e irradiados com diferentes doses de raios gama. Os valores em parenteses, dispostos ao lado do histograma representam a porcentagem de sobrevivência dos animais, após desafio com 5 DL50 de veneno nativo.

1.2.5.- Capacidade neutralizante

1.2.5.1.- Imunização

Durante o processo de imunização dos coelhos, as reações observadas no local do inóculo foram sempre mais pronunciadas nos grupos imunizados com venenos nativo, irradiado com 500 e 1000 Gy. A sobrevivência desses animais durante o período de imunização, foi 33,3%; 66,6% e 66,6%, respectivamente, enquanto nos grupos inoculados com 2000, 3000 e 4000 Gy a sobrevivência foi de 100%.

1.2.5.2.- Concentração proteica da fração IgG

O conteúdo proteico das soluções de IgG, obtidas por precipitação com sulfato de amônio, do "pool" de plasma de coelhos imunizados com venenos nativo e irradiados, foi estimado pela curva padrão de albumina bovina, cujos parâmetros e seus respectivos desvios foram: $A = 0,0125 \pm 0,0025$; $B = 3,0222 \pm 0,0000$ e $r = 0,9965$.

As concentrações proteicas das soluções de IgG, seus respectivos desvios e os rendimentos da fração IgG para cada grupo são mostrados na tabela XV. As diferenças observadas não são significativas, levando-se em consideração o número de animais utilizados.

TABELA XV

CONCENTRAÇÃO PROTEICA DAS SOLUÇÕES DE IgG
PURIFICADAS DO PLASMA DE COELHOS IMUNIZA-
DOS COM VENENOS NATIVO E IRRADIADOS

Antígeno	Concentração IgG (mg/ml)
veneno nativo	49,48 + 0,50
veneno 500 Gy	54,89 + 0,73
veneno 1000 Gy	40,07 + 0,60
veneno 2000 Gy	64,81 + 0,16
veneno 3000 Gy	71,80 + 3,02
veneno 4000 Gy	51,38 + 0,06

1.2.5.3.- Neutralização de atividade hemorrágica

Na tabela XVI encontram-se as porcentagens de atividade hemorrágica para cada grupo inoculado com as misturas antiveneno-veneno, os parâmetros das regressões lineares das curvas obtidas a partir desses dados e as doses efetivas 50% (DE₅₀). Os resultados indicam a mesma capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pelos venenos irradiados com 500, 1000 e 2000 Gy, em relação aos anticorpos induzidos pelo veneno nativo, e a diminuição dessa capacidade nos anticorpos induzidos por venenos irradiados com maiores doses.

TABELA XVI

NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA POR IgG PURIFICADA DO PLASMA
DE COELHOS IMUNIZADOS COM VENENOS NATIVO E IRRADIADOS

AMOSTRAS	ATIVIDADE HEMORRÁGICA (%)					A	B	DE 50 mg IgG/ mg veneno	
	mg IgG/ mg VENENO								r
	16,67	8,33	4,17	2,88	1,44				
ANTI NATIVO	59,6 ±1,4	63,4 ±9,9	82,6 ±7,7	96,5 ±28,3	100,0 ±28,7	-2,0654 0,9766	3,9220	13,27	
ANTI 500 Gy	35,8 ±3,1	78,8 ±9,5	88,0 ±21,0	97,1 ±9,1	106,3 ±11,7	-2,5344 0,9990	4,3468	13,23	
ANTI 1000 Gy	29,8 ±4,3	65,3 ±9,2	85,6 ±16,5	92,3 ±16,3	101,0 ±10,5	-3,2376 0,9990	4,4302	12,02	
ANTI 2000 Gy	38,1 ±7,6	55,0 ±4,4	74,7 ±1,9	84,1 ±7,3	107,2 ±4,6	6,0666 0,9543	3,6370	12,08	
ANTI 3000 Gy	54,3 ±5,4	69,1 ±11,3	85,0 ±5,3	106,0 ±13,4	103,7 ±5,8	1,0565 0,9391	2,6770	18,28	
ANTI 4000 Gy	68,8 ±5,8	75,6 ±13,6	80,0 ±18,2	92,9 ±16,2	98,9 ±5,1	2,7708 0,9634	2,4660	19,15	

1.2.5.4.- Neutralização de atividade edemaciante

Os valores de DE_{50} , encontrados no experimento de neutralização de atividade edemaciante, mostram que os anticorpos induzidos pelos venenos irradiados possuem a mesma capacidade neutralizante dos induzidos pelo veneno nativo. Na tabela XVII, encontram-se as porcentagens de atividade edemaciante para cada grupo inoculado com as misturas antiveneno-veneno, os parâmetros das regressões lineares das curvas obtidas a partir desses dados e as dose efetivas 50%.

TABELA XVII

NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE EDEMACIANTE POR IgG PURIFICADA DO PLASMA
DE COELHOS IMUNIZADOS COM VENENOS NATIVO E IRRADIADOS

AMOSTRAS	ATIVIDADE EDEMACIANTE (%)				A	B	DE 50 mg IgG/ mg veneno	
	mg IgG/ mg VENENO							r
	1960	980	490	245				
ANTI	44.1	55.8	82.9	99.7	1,27	31,13	1560	
NATIVO	$\pm 10,2$	$\pm 9,0$	$\pm 11,2$	$\pm 5,0$	0,9123			
ANTI	50,9	62,4	65,3	98,2	10,90	22,08	1770	
500 Gy	$\pm 9,2$	$\pm 12,6$	$\pm 12,8$	$\pm 6,1$	0,8113			
ANTI	41,0	54,5	60,4	72,5	27,99	16,40	1340	
2000 Gy	$\pm 6,3$	$\pm 9,7$	$\pm 5,0$	$\pm 12,8$	0,9571			
ANTI	63,9	70,2	83,4	87,1	17,90	12,60	2540	
3000 Gy	$\pm 12,7$	$\pm 10,2$	$\pm 10,0$	$\pm 7,8$	0,9465			
ANTI	54,7	56,8	68,0	73,1	32,28	10,0	1770	
4000 Gy	$\pm 7,9$	$\pm 9,5$	$\pm 10,7$	$\pm 9,2$	0,8827			

* A amostra de plasma dos animais imunizados com veneno irradiado com 1000 Gy não pode ser analisada por apresentar quantidade insuficiente para o ensaio.

2.- Irradiação com a dose de 2000 Gy na ausência e presença de "scavengers".

2.1. Concentração proteica

As concentrações proteicas das amostras nativa, irradiada (irradiado) e na presença de diferentes concentrações de nitrato de sódio e álcool butílico terciário, foram estimadas a partir de uma curva padrão de albumina bovina, cujos parâmetros foram: $A = 0,0158 \pm 0,0021$; $B = 0,0032 \pm 0,0000$ e $r = 0,9982$. A análise de variância aplicada à regressão indicou nível de significância zero até a sexta casa decimal.

Os resultados mostram a manutenção da concentração proteica das amostras, com exceção das irradiadas na presença de 1,5M e 2,0M de álcool butílico terciário, que apresentaram diminuição do conteúdo proteico da ordem de 51,5% e 68,2%, respectivamente (tabela XVIII).

As alíquotas de veneno nativo também apresentaram manutenção do conteúdo proteico após incubação com as diferentes concentrações de nitrato de sódio e álcool butílico terciário utilizadas.

TABELA XVIII

CONCENTRAÇÃO PROTEICA DAS AMOSTRAS NATIVA E IRRADIADAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE SÓDIO (NS) E ÁLCOOL BUTÍLICO TERCIÁRIO (BUT)

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO µg/ml	CONCENTRAÇÃO RELATIVA(%)
NATIVA	1895+5 *	100,0
2000 Gy	1902+8 *	100,4
NS0,001M	1879+6 *	99,1
NS 0,005M	1895+8 *	100,0
NS 0,01M	1875+10*	98,9
NS 0,05M	1887+4 *	99,5
NS 0,1M	1925+8 *	101,6
BUT 0,1M	1872+6 *	98,7
BUT 0,5M	1895+5 *	100,0
BUT 1,0M	1800+10*	95,0
BUT 1,5M	919+6 **	48,5
BUT 2,0M	603+3 **	31,8

* Diferenças não significativas
 ** Diferenças significativas
 Segundo teste t-Student (P= 0,005)

2.2.- Espectro de absorção em ultravioleta

Os espectros de absorção, na região ultravioleta, das amostras irradiadas na presença de diferentes concentrações de nitrato de sódio, foram semelhantes à amostra controle irradiada com 2000 Gy e aumentados em relação à amostra nativa (figuras 21 a 26).

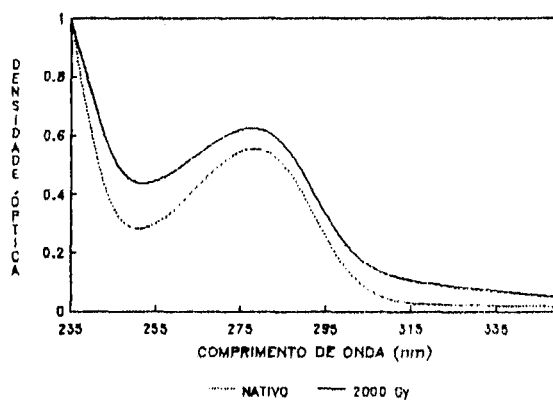


Figura 21: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy.

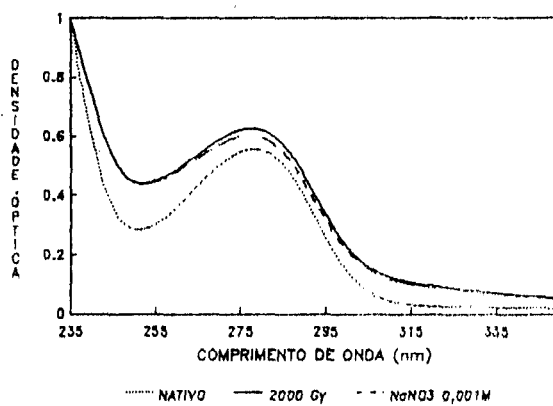


Figura 22: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,001M de NaNO_3 .

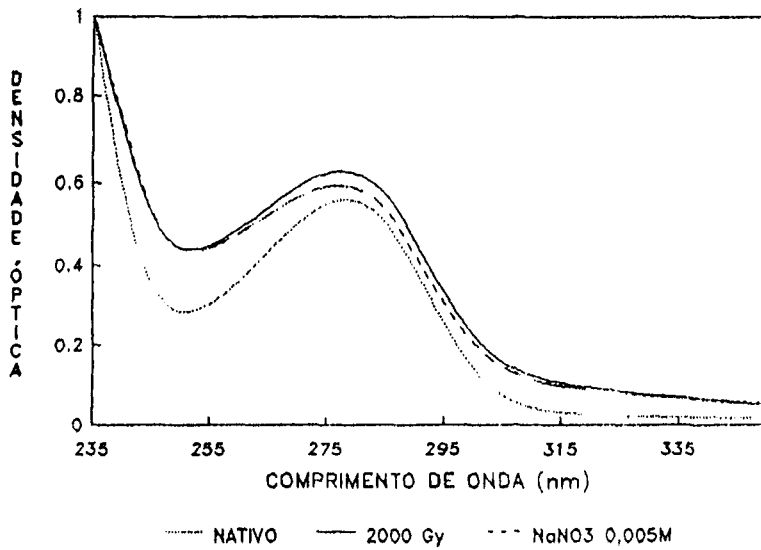


Figura 23: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,005M de NaNO3.

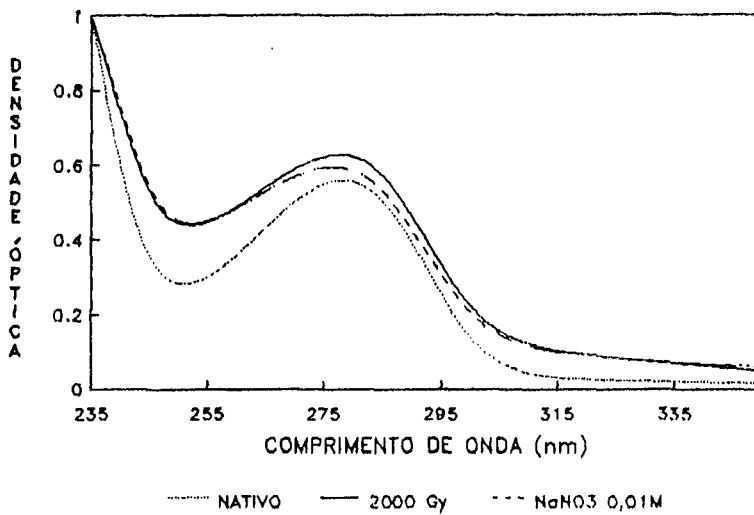


Figura 24: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,01M de NaNO3.

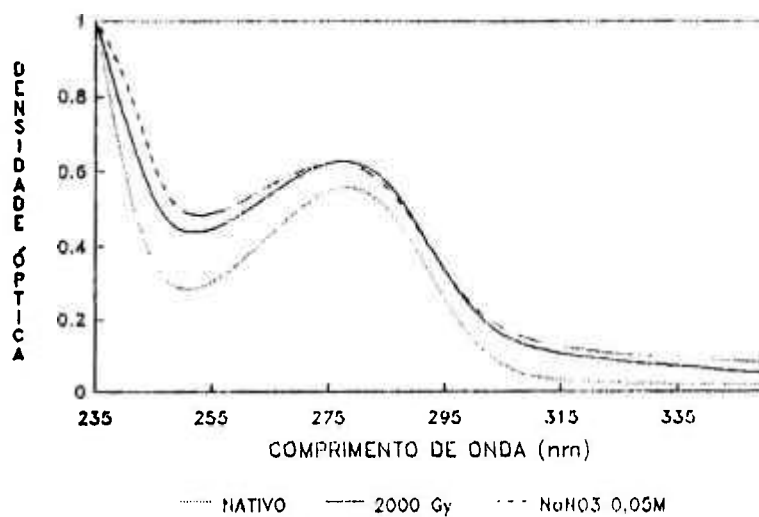


Figura 25: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,05M de NaNO₃.

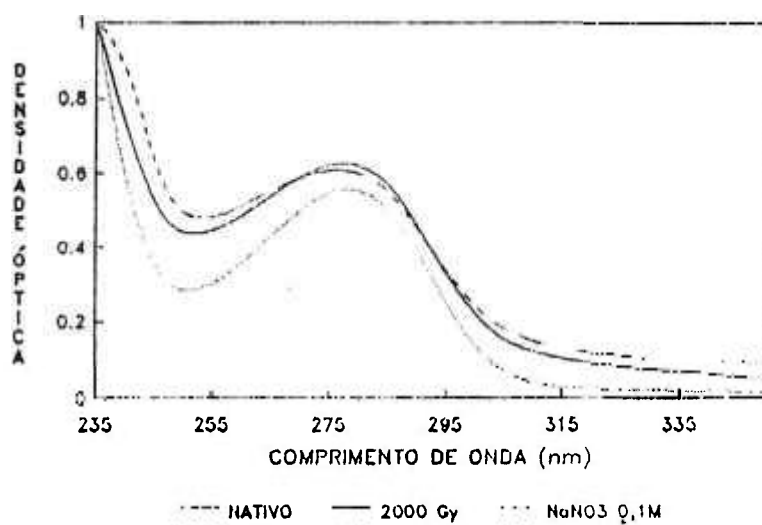


Figura 26: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,1M de NaNO₃.

Por outro lado, as amostras irradiadas na presença de 0,5M; 1M e 1,5M de álcool butílico terciário apresentaram coeficiente de extinção molar semelhante à amostra nativa (figuras 27,28 e 29).

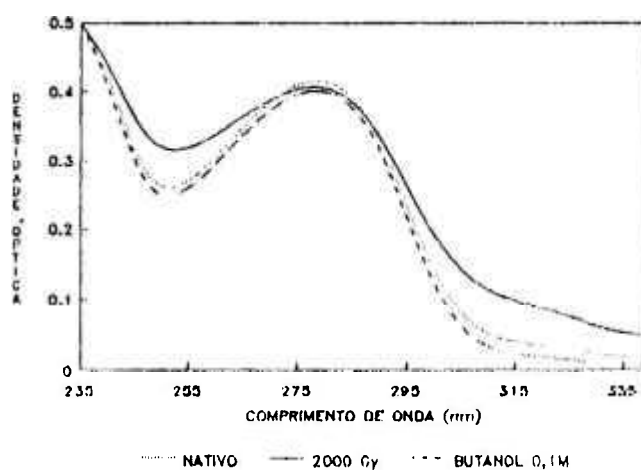


Figura 27: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,1M de butanol.

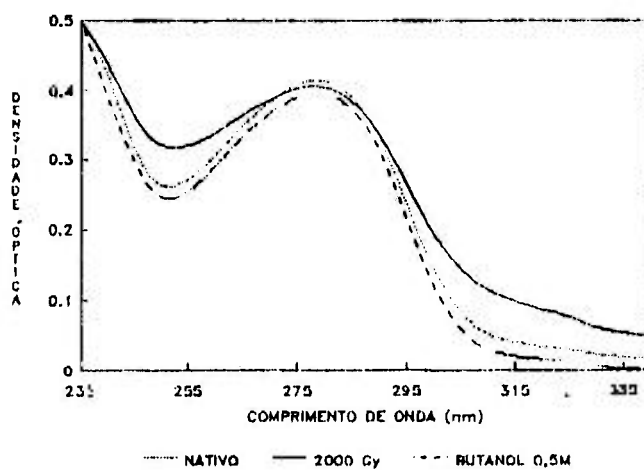


Figura 28: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,5M de butanol.

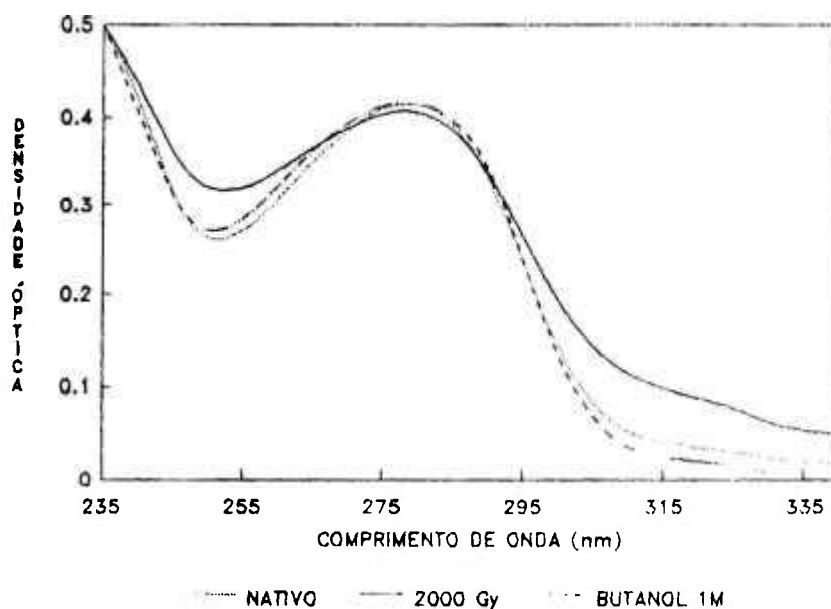


Figura 29: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 1M de butanol.

O espectro de absorção da amostra contendo 1,5M de álcool butílico terciário apresentou absorção em 249 nm intermediária entre os venenos controles nativo e irradiado, e na região de 260 a 295 nm, aumentado em relação ao irradiado (figura 30).

A figura 31 mostra o aumento do coeficiente de extinção molar da amostra contendo 2M do mesmo "scavenger", em relação às amostras nativa e controle irradiado.

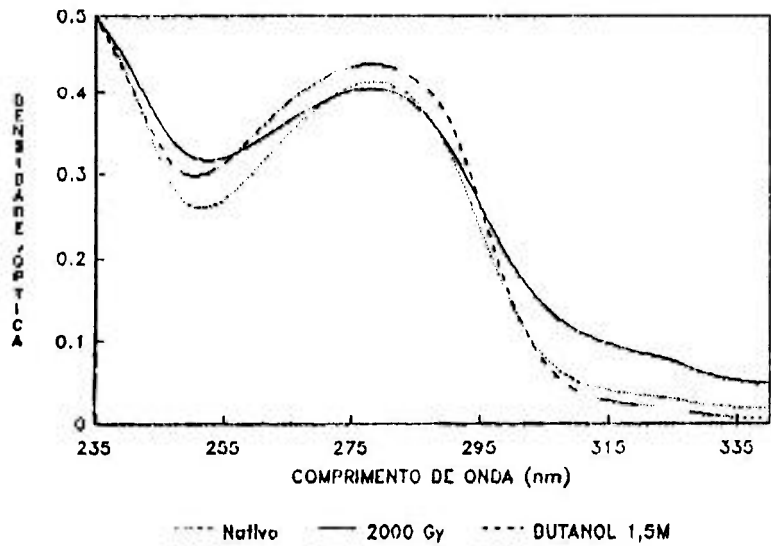


Figura 30: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 1,5M de butanol.

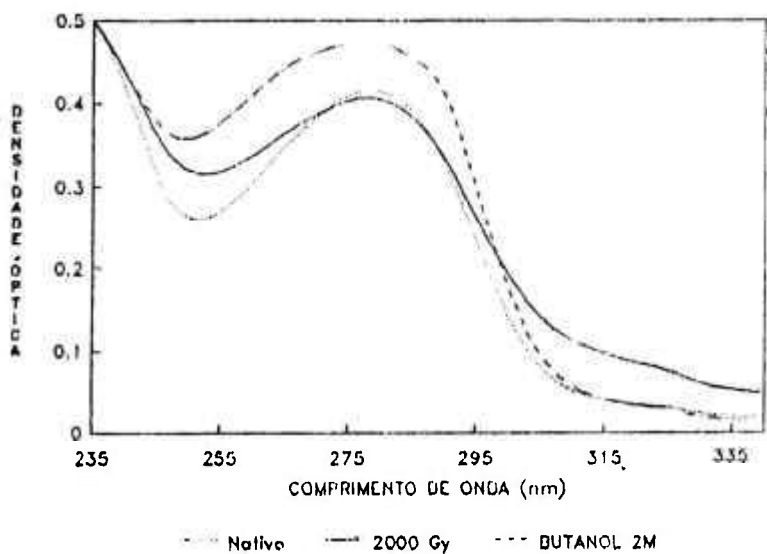


Figura 31: Espectros de absorção de venenos nativo e irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 2M de butanol.

2.3.- Cromatogramas em TSK G 3000 (HPLC)

As figuras 32 e 33 apresentam os cromatogramas dos venenos nativo e irradiado com 2000 Gy (controle) em coluna de TSK G3000 SW, evidenciando a melhoria da separação em relação à obtida pela coluna de Sephacryl S-200, apresentada na figura 5 (página 62).

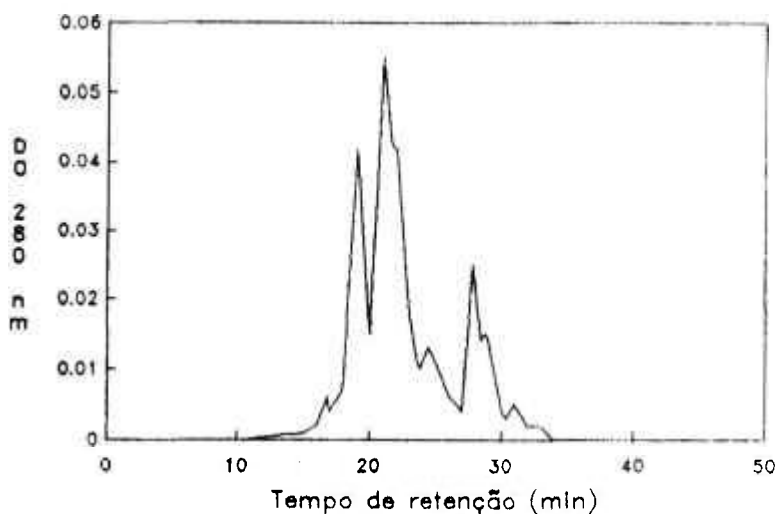


Figura 32: Cromatograma de veneno de jararaca nativo, em HPLC.

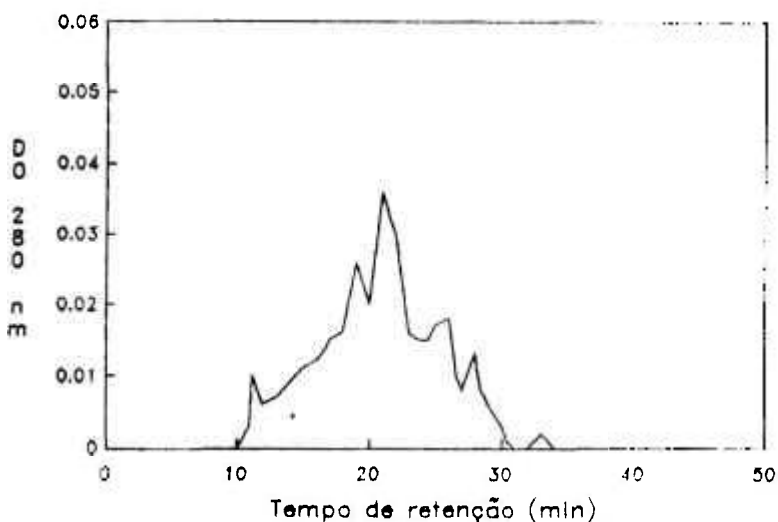


Figura 33: Cromatograma de veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy, em HPLC.

As figuras 34 a 38 mostram a identidade entre os perfis cromatográficos das amostras irradiadas na presença de diferentes concentrações de nitrato de sódio e da amostra controle irradiada.

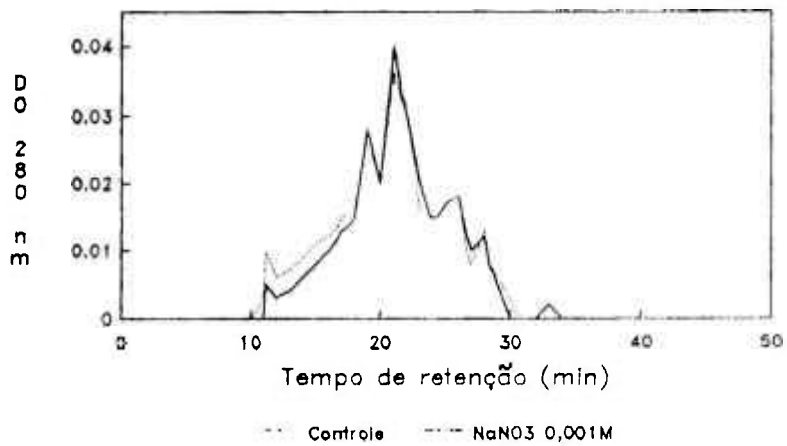


Figura 34: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,001M de NaNO_3 .

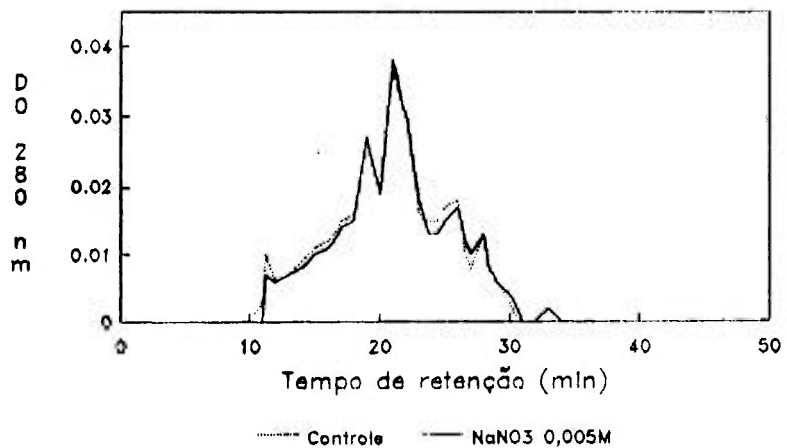


Figura 35: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,005M de NaNO_3 .

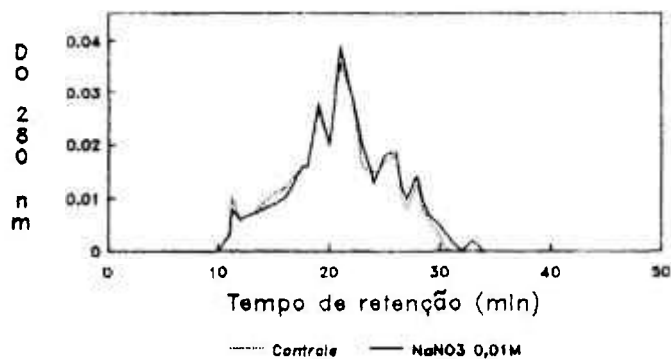


Figura 36: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,01M de NaNO₃.

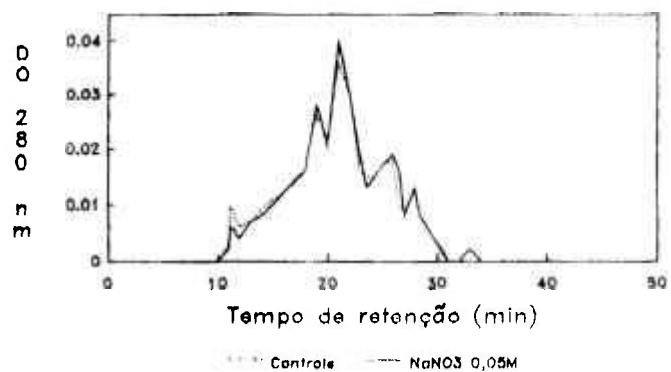


Figura 37: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,05M de NaNO₃.

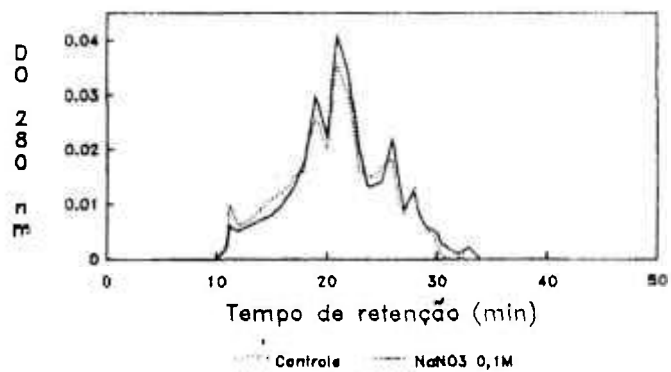


Figura 38: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,1M de NaNO₃.

As alterações nos cromatogramas das amostras irradiadas na presença de 0,1M; 0,5M e 1M de álcool butílico terciário em relação à amostra controle irradiada podem ser vistas nas figuras 39, 40 e 41, indicando quebra de proteínas em solução.

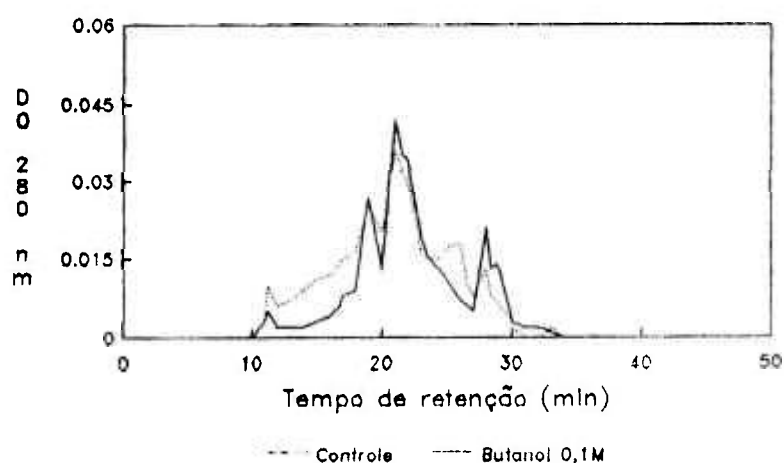


Figura 39: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,1M de butanol.

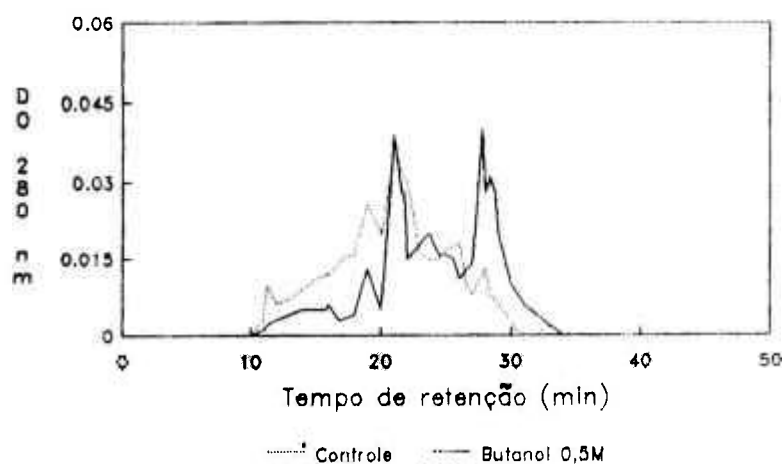


Figura 40: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 0,5M de butanol.

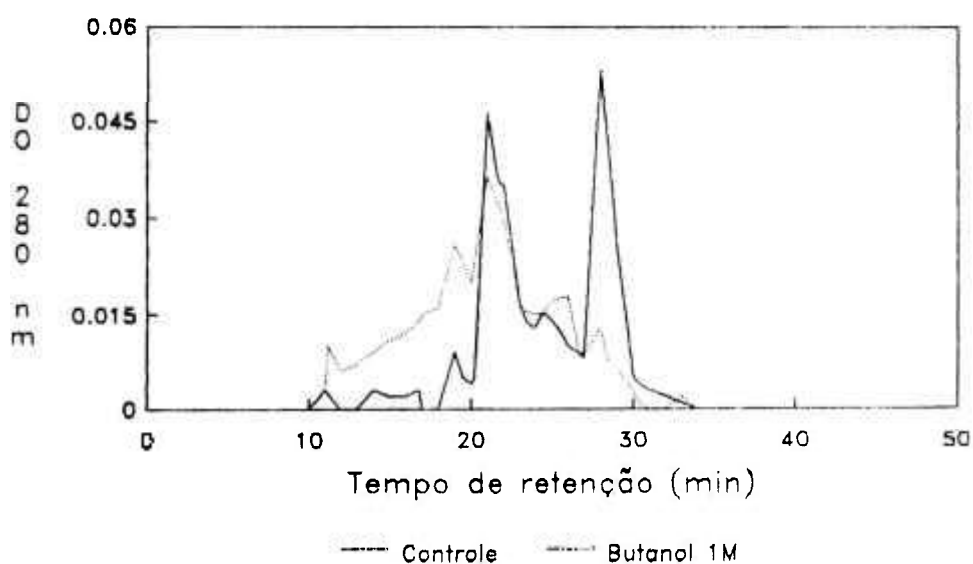


Figura 41: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 1M de butanol.

Na figura 42 nota-se o aparecimento de uma fração de peso molecular elevado, enquanto a figura 43 indica o aumento de frações de baixo peso molecular. Cabe ressaltar que somente a parte solúvel das amostras irradiadas na presença de 1,5M e 2M de álcool butílico terciário foi analisada.

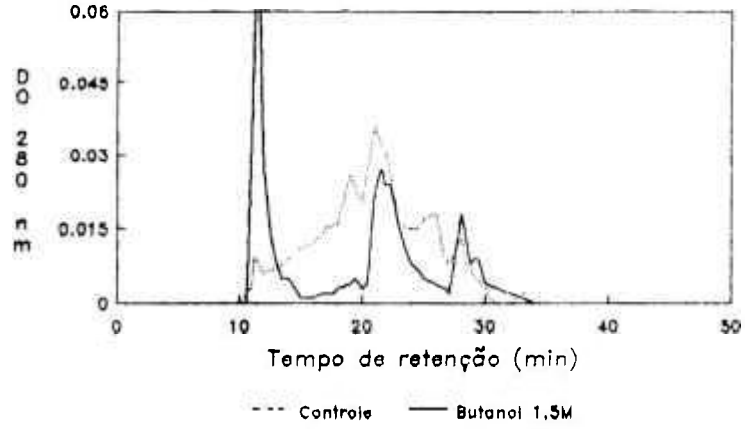


Figura 42: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 1,5M de butanol.

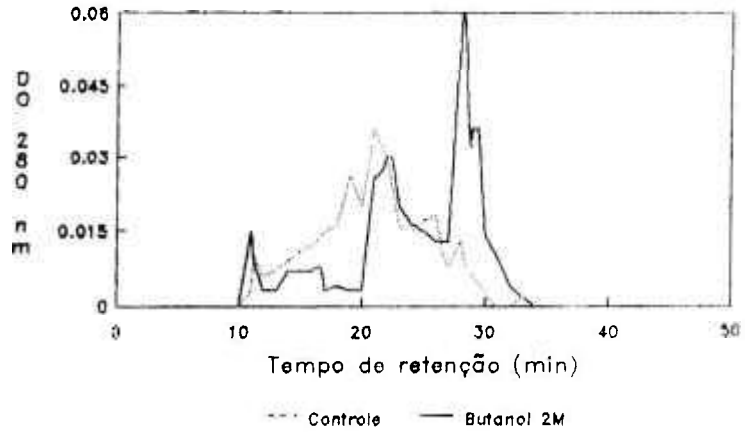
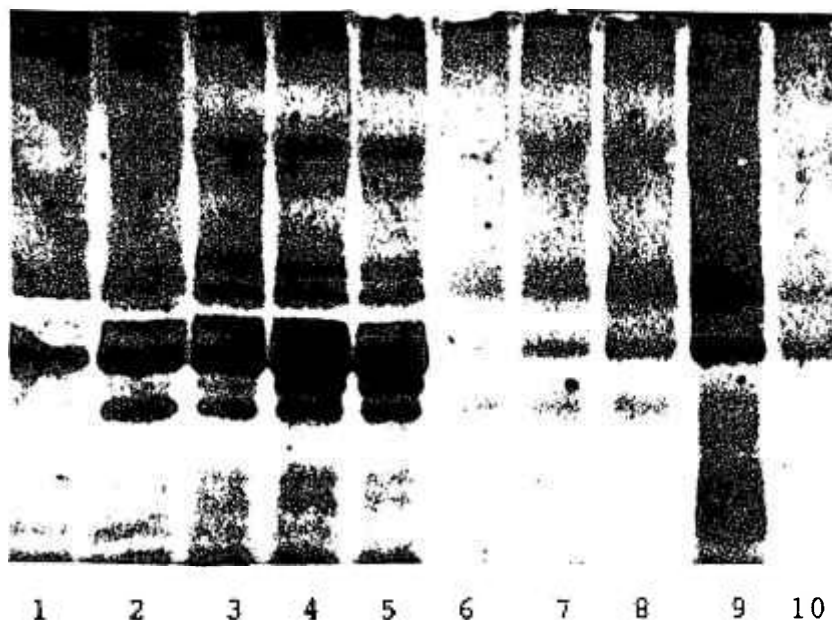


Figura 43: Cromatogramas de venenos irradiados com 2000 Gy, controle e na presença de 2M de butanol.

Os perfis cromatográficos das amostras de veneno nativo incubadas com 0,001M a 0,1M de nitrato de sódio e 0,1M a 2M de álcool butílico terciário apresentaram-se idênticos ao da amostra nativa.

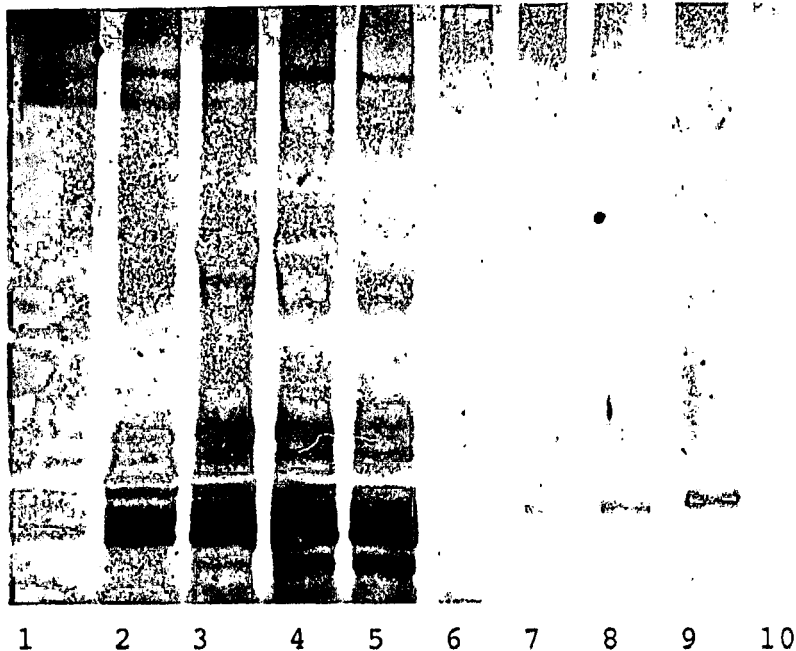
2.4.- Eletroforese em EGPA-SDS

Os resultados apresentados nas figuras 44 e 45, concordam com os obtidos nas cromatografias (mostradas no item anterior), porém não evidenciam o aumento da fração de baixo peso molecular, observado nas amostras irradiadas com 2000 Gy na presença de 1,5M e 2M de álcool butílico terciário.



(1) BUT 2M (2) BUT 1,5M (3) BUT 1M (4) BUT 0,5M
 (5) BUT 0,1M (6) NS 0,1M (7) NS 0,05M
 (8) NS 0,01M (9) NS 0,005M (10) NS 0,001M

FIGURA 44: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12,5% COM SDS, DE VENENOS NATIVO, IRRADIADOS COM 2000 Gy NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE SÓDIO (NS) E ÁLCOOL BUTÍLICO TERCIÁRIO (BUT), CORADA COM NITRATO DE PRATA. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS COM URÉIA, 2-MERCAPTOETANOL E SDS.



(1) BUT 2M (2) BUT 1,5M (3) BUT 1M (4) BUT 0,5M
 (5) BUT 0,1M (6) NS 0,1M (7) NS 0,05M
 (8) NS 0,01M (9) NS 0,005M (10) NS 0,001M

FIGURA 45: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10% COM SDS, DE VENENOS NATIVO, IRRADIADOS COM 2000 Gy NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE SÓDIO (NS) E ÁLCOOL BUTÍLICO TERCIÁRIO (BUT), CORADA COM NITRATO DE PRATA. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS COM SDS.

As amostras de veneno nativo incubadas com as diferentes concentrações dos "scavengers" utilizados mostraram padrões eletroforéticos idênticos à amostra nativa, em ambas eletroforeses.

2.5.- Atividades enzimáticas e biológicas

As atividades proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante foram protegidas conforme a concentração do "scavenger" presente durante a irradiação (figuras 49 a 57).

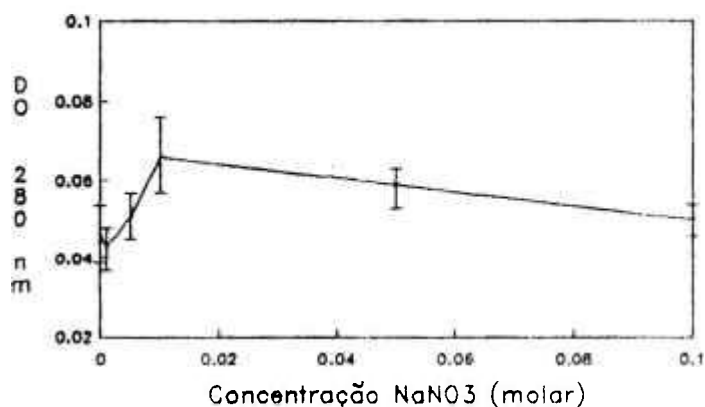


Figura 46: Efeito da concentração de NaNO₃ na atividade proteolítica do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

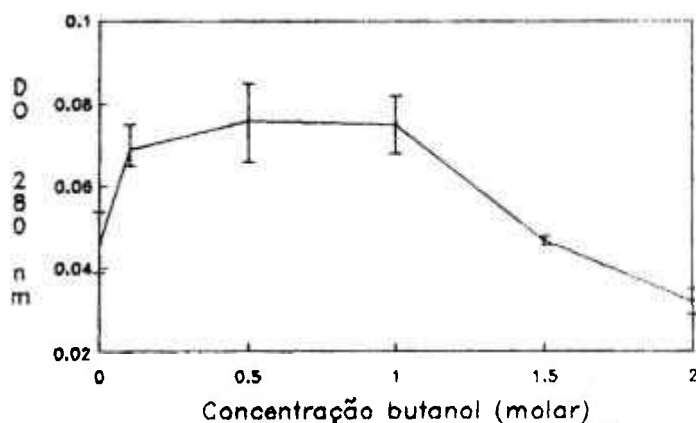


Figura 47: Efeito da concentração de butanol na atividade proteolítica do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

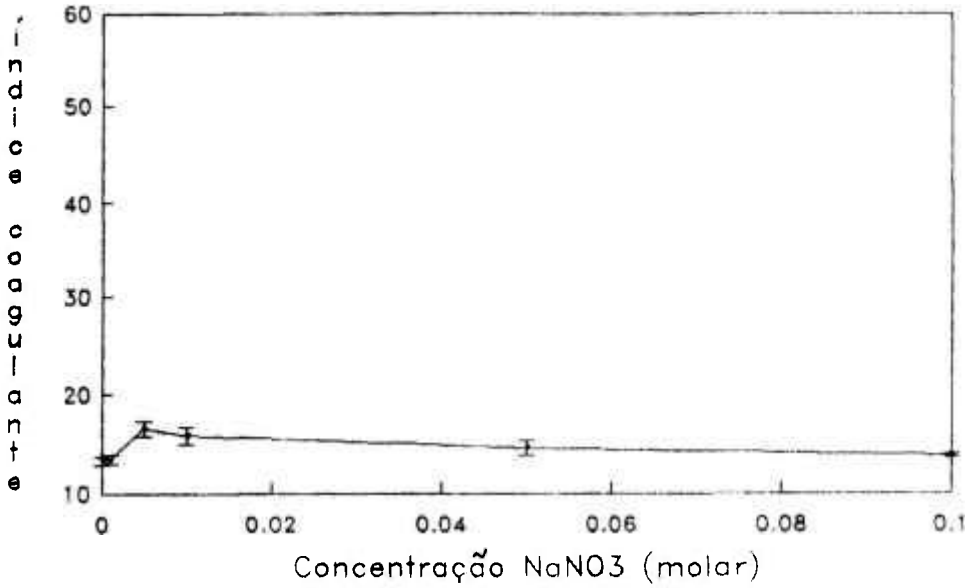


Figura 48: Efeito da concentração de NaNO3 na atividade coagulante do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

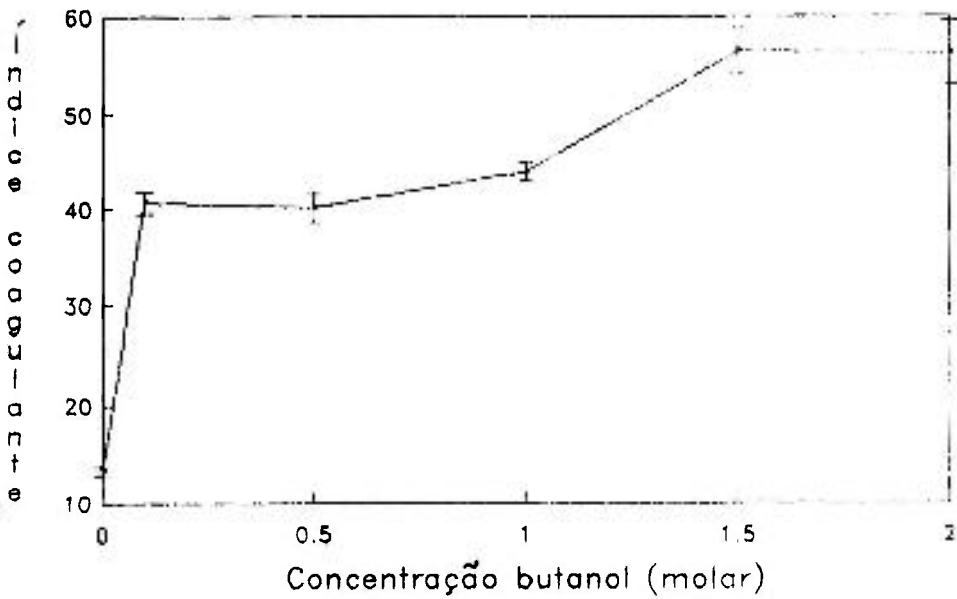


Figura 49: Efeito da concentração de butanol na atividade coagulante do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

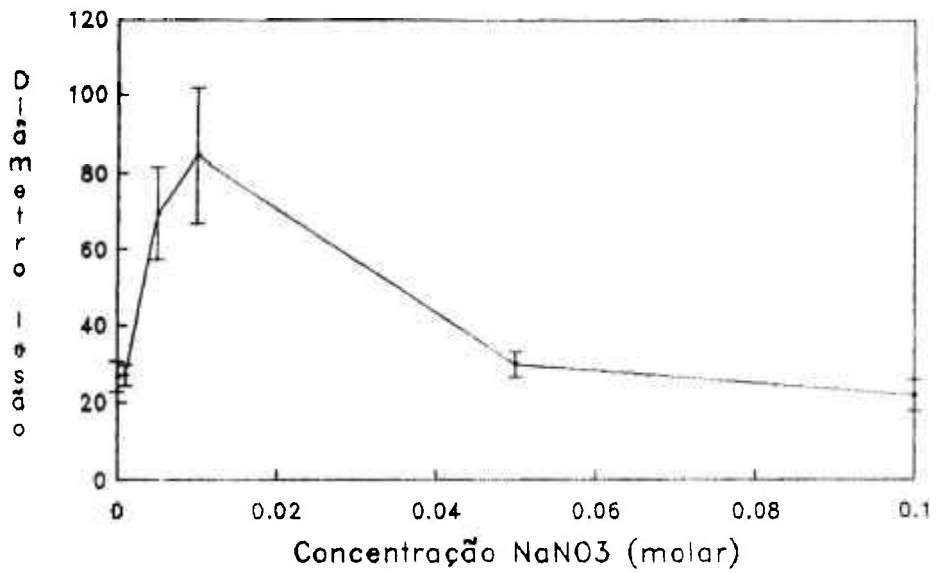


Figura 50: Efeito da concentração de NaNO3 na atividade hemorrágica do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

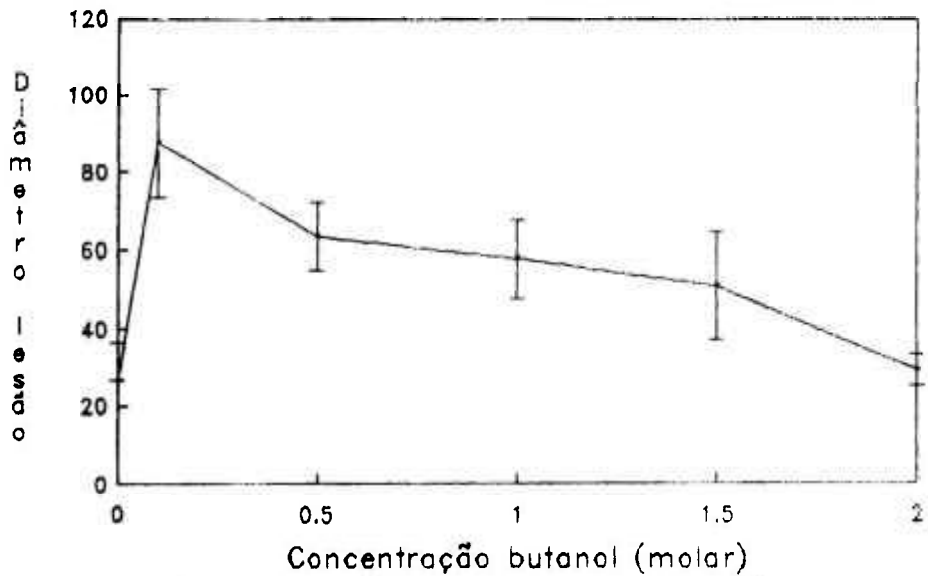
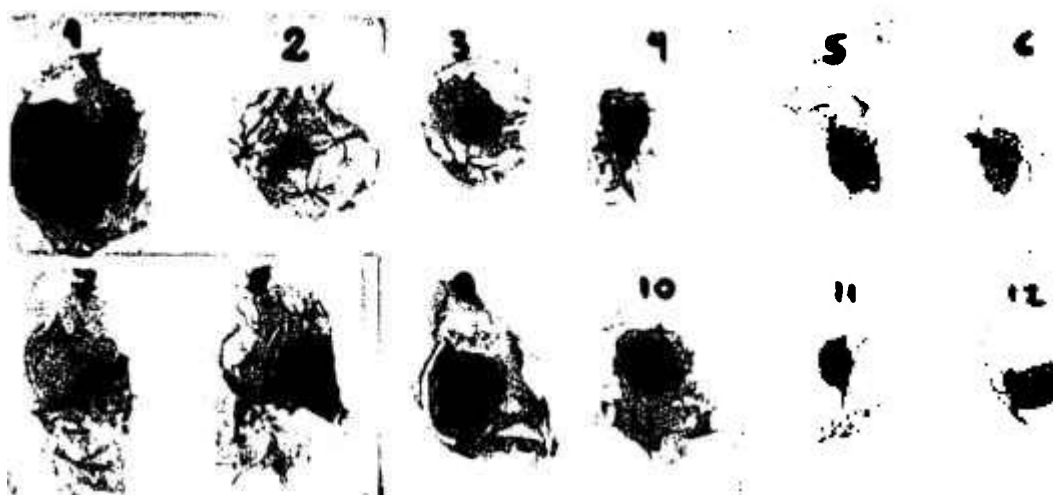


Figura 51: Efeito da concentração de butanol na atividade hemorrágica do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.



(1) NATIVO (2) 2000 Gy (3) NS 0,001M (4) NS 0,005M
 (5) NS 0,01M (6) NS 0,05M (7) NS 0,1M (8) BUT 0,1M
 (9) BUT 0,5M (10) BUT 1M (11) BUT 1,5M (12) BUT 2M

FIGURA 52: ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE VENENOS DE JARARACA NATIVO E IRRADIADOS COM 2000 Gy, CONTROLE E CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE SÓDIO (NS) E ÁLCOOL BUTÍLICO TERCIÁRIO (BUT), EM CAMUNDONGOS.

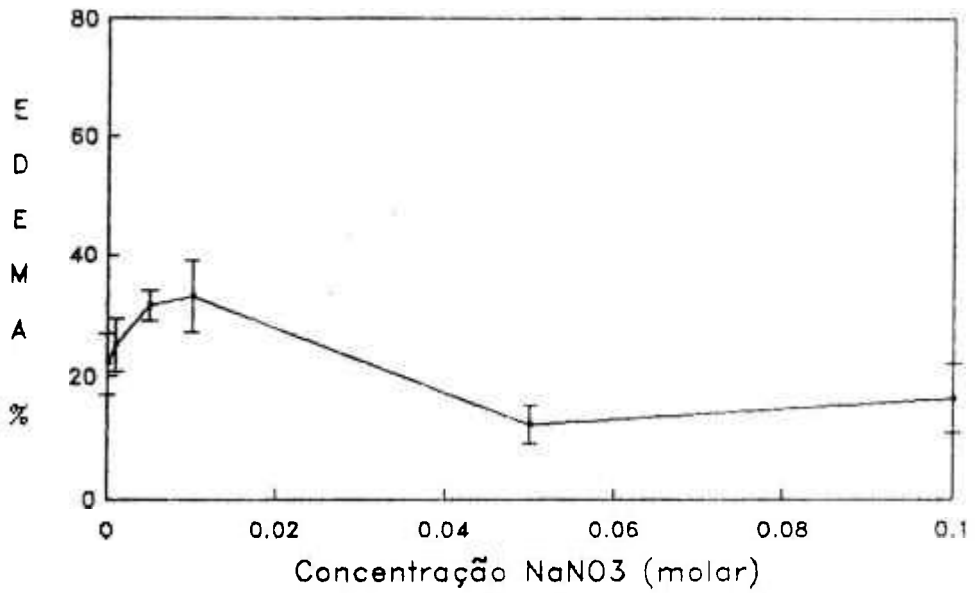


Figura 53: Efeito da concentração de NaNO3 na atividade edemaciante do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

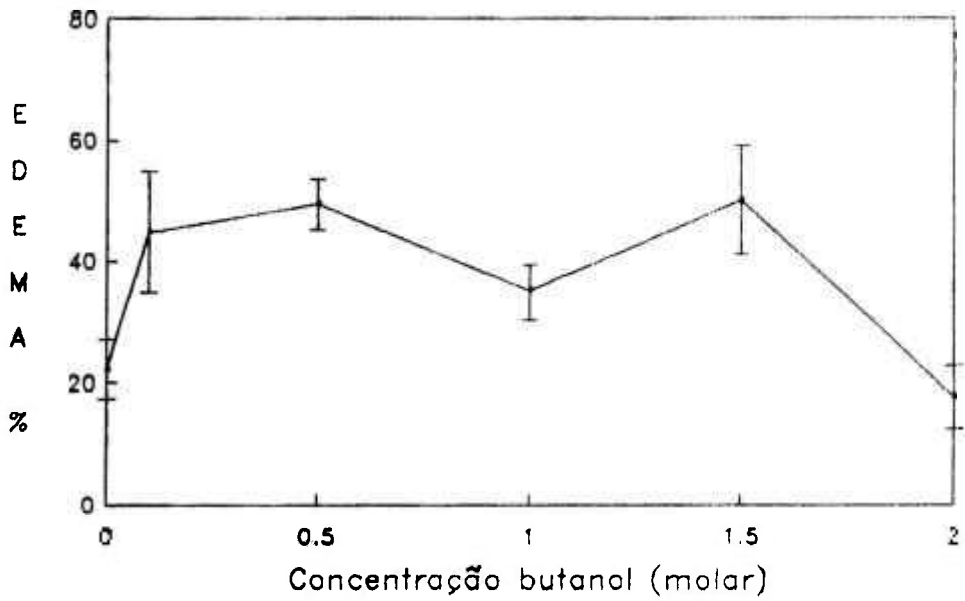


Figura 54: Efeito da concentração de butanol na atividade edemaciante do veneno de jararaca irradiado com 2000 Gy.

As atividades específicas de cada amostra e as porcentagens de radioproteção das diferentes concentrações de "scavengers" para cada atividade testada são mostradas na tabela XIX.

TABELA XIX

CAPACIDADE RADIOPROTETORA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS "SCAVENGERS",
NITRATO DE SÓDIO (NS) E BUTANOL (BUT), SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS
E BIOLÓGICAS DO VENENO DE JARARACA IRRADIADO COM 2000 Gy

AMOSTRAS	UNIDADES/ mg				RADIOPROTEÇÃO			
	ATIVIDADES				ATIVIDADES			
	PROTEOL.	COAGUL.	HEMOR.	EDEMAC.	PROTEOL.	COAGUL.	HEMOR.	EDEMAC.
NATIVA	35,17	22,07	34,0	21,92	-	-	-	-
2000 Gy	15,43	5,32	8,9	7,37	-	-	-	-
NS 0,001M	14,17	5,39	9,0	8,34	0	0	0	0
NS 0,005M	16,93	6,61	23,2	10,5	0	0	57,0	21,5
NS 0,01M	22,1	6,32	28,1	11,0	33,8	0	76,5	24,9
NS 0,05M	19,54	5,82	9,9	4,02	20,3	0	0	0
NS 0,1M	16,77	5,51	7,2	5,48	0	0	0	0
BUT 0,1M	23,23	16,26	29,2	14,92	39,5	65,3	80,9	51,9
BUT 0,5M	25,17	16,06	21,1	16,46	49,3	64,1	48,6	62,5
BUT 1M	25,0	17,55	19,2	11,65	48,5	73,0	41,0	29,4
BUT 1,5M	19,67	22,58	18,7	17,78	21,5	100,0	39,0	71,1
BUT 2M	10,6	22,52	9,8	5,8	< 0	100,0	0	0

A ausência de radioproteção foi determinada pelos resultados do teste t-Student, aplicado para testar a significância das diferenças observadas nas atividades da amostra irradiada com 2000 Gy, em relação as amostras irradiadas na presença de "scavengers".

A determinação das atividades enzimáticas e biológicas das alíquotas de veneno nativo incubadas com 0,001 a 0,1M de nitrato de sódio e 0,1 a 2M de álcool butílico terciário, apresentou resultados estatisticamente iguais aos da amostra nativa para todas as atividades, com exceção da amostra contendo 2M de álcool butílico terciário, que apresentou redução das atividades proteolítica e hemorrágica, da ordem de 35,8% e 45,5%, respectivamente.

V - DISCUSSÃO

Estudos sobre os aspectos bioquímicos de proteínas isoladas submetidas à irradiação são numerosos. Nayar & Srinivasan¹⁰⁸, irradiando acetilcolinesterase, observaram a quebra da enzima em duas partes, aumento da densidade óptica na região ultravioleta e decréscimo da atividade da enzima. Mudanças na estrutura secundária também foram descritas por Dertinger & Jung³⁴ em pesquisas com ribonuclease irradiada.

Por outro lado, trabalhos envolvendo venenos ofídicos, na sua maioria, restringiram-se à determinação da toxicidade, das atividades enzimáticas e da capacidade imunológica das proteínas irradiadas.

Excetuando Baride e colaboradores¹⁰, que demonstraram que o tratamento de venenos das serpentes *Naja naja*, *Echis carinatus* e *Vipera russeli* com radiação gama, resultou na formação de polímeros, e os estudos de Murata¹⁰³, Costa²⁷, Nascimento¹⁰⁷ e Souza Filho e colaboradores¹⁴², com veneno de *Crotalus durissus terrificus* e suas toxinas isoladas (crotamina e crotoxina), respectivamente, que demonstraram mudanças conformacionais e precipitação das proteínas do veneno total irradiado, determinaram o radical livre ativo na alteração da antigenicidade da crotamina irradiada, e a formação de agregados e mudanças conformacionais na crotoxina irradiada; pouca ênfase foi dada à determinação das alterações bioquímicas dos venenos irradiado e mecanismo de ação dos raios gama.

Souza Filho e colaboradores¹⁴² e Murata¹⁰³ observaram a precipitação de 59% e 65% do conteúdo proteico da crotoxina e veneno total de cascavel irradiados com a dose de 2000 Gy, na concentração de 2 mg/ml, respectivamente; enquanto Nascimento¹⁰⁷ conseguiu inibir a precipitação da crotoxina irradiada nas mesmas condições, acidificando o meio de irradiação. Lauhratinananda e colaboradores⁸⁴ mostraram que a precipitação do veneno de serpentes da Tailândia era inibida, se a concentração das soluções submetidas à irradiação fosse reduzida de 20 mg/ml para 10 mg/ml. Puranananda¹¹⁷ e Kankonkar e colaboradores⁷⁸, não observaram precipitação de venenos, de diferentes espécies de serpentes, irradiados com doses de 20000 a 30000 Gy.

Sabendo-se que, dependendo das características do material irradiado e das condições utilizadas, a radiação gama pode causar precipitação de proteínas, o primeiro aspecto abordado no estudo dos efeitos da radiação no veneno de *Bothrops jararaca* foi a determinação da concentração proteica do material irradiado com as doses de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 Gy.

A manutenção do conteúdo proteico, em todas as doses de radiação, facilitou o estudo, a possibilidade do uso do material irradiado no processo de obtenção de antissoros e comprovou a importância das condições empregadas para obtenção do efeito final da irradiação.

As mudanças nas propriedades bioquímicas do veneno de jararaca foram detectadas pela presença de agregados proteicos nas amostras irradiadas com as doses de 2000, 3000 e 4000 Gy e aumento do coeficiente de extinção molar, proporcionalmente ao aumento da dose de radiação.

Embora a indução de agregados em proteínas irradiadas tenha sido frequentemente detectada, a natureza das ligações químicas envolvidas nesse processo ainda não foi determinada exatamente. Hajos & Delinncée⁵⁷ e Cheung e colaboradores²³, através do estudo de ribonuclease e colágeno irradiados, respectivamente, evidenciaram a existência de ligações covalentes e não covalentes entre os agregados, sendo 40 a 45% das covalentes consistindo em pontes dissulfeto; Baride e colaboradores¹⁰ concluíram que os agregados detectados nos venenos de serpentes indianas irradiados eram formados por ligações fracas; enquanto Schussler & Herget¹³⁷ e Garrison⁴⁴ observaram que a presença de oxigênio inibia a agregação, e quando este não estava presente, os complexos proteicos eram formados por ambas ligações.

Os resultados obtidos nas cromatografias e eletroforeses dos venenos de jararaca nativo e irradiados concordam com os obtidos por Hajós e Dellincée⁵⁷, indicando que na formação de agregados estão envolvidas tanto ligações não covalentes, quanto covalentes.

O aumento da densidade óptica das proteínas do veneno de jararaca, na região ultravioleta, à medida que a dose de radiação aumenta, indica mudanças conformacionais que podem

ser decorrentes da exposição de grupos cromóforos, antes "escondidos" em regiões hidrofóbicas, para regiões relativamente polares, pelo desdobramento de cadeias polipeptídicas. Esses resultados concordam com os achados de Nayar & Srinivasan¹⁰⁸, com acetilcolinesterase; Chanderkar e colaboradores²², com fibrinogênio bovino; Sundaram e colaboradores¹⁴⁴, com veneno de *Naja naja* e Baride e colaboradores¹⁰, com venenos de serpentes indianas.

Além das alterações bioquímicas, as atividades consideradas relevantes (proteolítica, coagulante, hemorrágica e edemaciante) foram avaliadas, detectando-se o decréscimo das mesmas, proporcionalmente ao aumento da dose de radiação e diferenças no grau de radiosensibilidade das proteínas. A menor resistência à radiação das enzimas com atividade coagulante e maior das enzimas caseinolíticas concordam com os resultados obtidos por Yarleque¹⁶¹ e Herrera e colaboradores⁶⁴, com venenos de *Lachesis muta* e *Bothrops atrox* irradiados.

Os resultados das metodologias realizadas com as alíquotas de veneno nativo, incubadas à temperatura ambiente durante o período de irradiação de cada amostra, excluíram a possibilidade das alterações observadas nas amostras irradiadas terem sido causadas pelo tempo de exposição a temperatura ambiente e não por ação dos raios gama.

Ao avaliarmos a toxicidade das amostras em relação à amostra nativa, obtivemos a atenuação de forma exponencial com o aumento da dose de radiação. Quando comparamos o nível de atenuação obtido nas mesmas condições experimentais, na dose de 2000 Gy, com os resultados relativos à irradiação do veneno de cascavél e crotoxina, apresentados por Murata¹⁰³ e Nascimento¹⁰⁷, respectivamente, notamos que o nível de atenuação é semelhante para os venenos totais de jararaca (6,8 vezes) e cascavél (5 vezes) e de 15 vezes para a crotoxina. Esse fato sugere que toxinas purificadas são mais sensíveis à radiação do que amostras não purificadas, provavelmente, devido à proteção mútua dos componentes presentes, corroborando as conclusões de Baride e colaboradores¹⁰ e Skalka & Antoni¹⁴¹.

Uma vez analisados os aspectos bioquímicos, as alterações nas atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas, promovidas no veneno de jararaca, tornava-se importante estabelecer os efeitos da radiação nas propriedades imunológicas do veneno.

Os resultados da imunodifusão dupla radial, que permitiu o estudo do comportamento antigênico das amostras nativa e irradiadas, frente ao mesmo sistema de anticorpos, indicam que a capacidade antigênica das amostras foi mantida em todas as doses de radiação testadas.

A manutenção da antigenicidade das amostras irradiadas, foi confirmada pelas técnicas de "immunoblotting" e

imunoprecipitação. A primeira, evidenciando a reação das frações proteicas da amostra nativa e das irradiadas, com os anticorpos do soro antibotrópico, e a segunda, cuja análise quantitativa, demonstrou a capacidade de ligação dos antígenos irradiados aos anticorpos induzidos por venenos botrópicos, embora tenha detectado modificações na interação antígeno-anticorpo nas amostras irradiadas com doses maiores que 500 Gy.

Os estudos das propriedades imunológicas do veneno de jararaca irradiado, *in vivo*, foram incentivados pelos estudos de Puranananda^{117,118}, onde mesmo amostras irradiadas, cujas características antigênicas não puderam ser detectadas por imunodifusão, foram capazes de induzir a produção de anticorpos efetivos na neutralização dos efeitos tóxicos do veneno nativo; e pelos estudos de Murata^{103,104} com veneno crotálico irradiado, onde apesar de resultados semelhantes aos descritos para o veneno de jararaca, nas técnicas de imunodifusão e imunoprecipitação, foi evidenciada a habilidade do veneno irradiado de induzir a formação de anticorpos efetivos na proteção contra o veneno homólogo.

Os experimentos de imunização de camundongos com as amostras nativa e irradiadas, desafio desses camundongos com veneno nativo; imunização de coelhos, purificação dos anticorpos e determinação das doses efetivas 50% para as atividades hemorrágica e edemaciante, tiveram o intuito de comparar a capacidade imunogênica das amostras e a

capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos a partir das mesmas.

A manutenção da capacidade imunogênica dos venenos irradiados foi demonstrada pela semelhança dos títulos de anticorpos dos soros de camundongos e das concentrações de imunoglobulinas (IgG), purificadas do plasma dos coelhos.

É importante salientar que os animais imunizados sofreram os efeitos tóxicos dos venenos, durante o processo de imunização, tanto menores quanto maiores foram as doses de radiação utilizadas no tratamento dos mesmos.

Quanto à neutralização da toxicidade, a partir da sobrevida dos camundongos imunes após o desafio com veneno nativo, podemos inferir que os venenos irradiados com 500, 1000 e 2000 Gy induzem a formação de anticorpos com alta capacidade neutralizante. Por outro lado, as amostras irradiadas com 3000 e 4000 Gy, embora induzam a formação de anticorpos, estes mostram-se ineficientes na proteção contra o veneno homólogo.

Cabe ressaltar que Baride e colaboradores¹⁰ salientam a eficiência de proteínas de alto peso molecular na imunidade contra fatores tóxicos, e Nascimento¹⁰⁷, a partir dos resultados da biodistribuição de crotoxina nativa e irradiada, em camundongos, sugere que a formação de agregados proteicos dificulta a disseminação da crotoxina irradiada pelo organismo dos animais, impedindo a chegada da mesma em concentrações ótimas nos locais de ação.

Em relação aos experimentos de neutralização das atividades biológicas, os resultados mostraram que os anticorpos induzidos pelos venenos nativo e irradiados com todas as doses utilizadas possuem a mesma eficiência na neutralização da atividade edemaciante do veneno nativo, enquanto a capacidade de neutralizar a atividade hemorrágica do veneno nativo foi reduzida nas amostras irradiadas com 3000 e 4000 Gy. As evidências experimentais corroboram as conclusões de Gené e colaboradores⁴⁵, sugerindo que a neutralização dos efeitos letais do antissoro pode não estar relacionada à neutralização dos efeitos patofarmacológicos.

Uma vez determinados os aspectos bioquímicos, biológicos e imunológicos do veneno de *B. jararaca* submetido a diferentes doses de radiação gama, tornava-se necessária a utilização de "sequestradores" de radicais livres, para o estudo do mecanismo de ação dos raios gama e determinação dos radicais livres responsáveis pelas alterações observadas.

Em função dos resultados obtidos e da importância dos radicais hidroxila e elétron hidratado no efeito indireto da radiação, a dose de 2000 Gy e os "scavengers", nitrato de sódio e álcool butílico terciário, foram escolhidos como parâmetros para esse estudo.

Em todas as metodologias realizadas com as amostra irradiadas na presença desses compostos, tornou-se evidente a importância da concentração dos mesmos para que a

radioproteção fosse obtida, conforme destacado por Adams^{1,2,3} e Czapski^{29,30}.

Concordando com as afirmações de Garrison⁴⁴, Greenstock⁴⁹, Adams^{1,2,3} e Chanderkar e colaboradores²², o radical hidroxila mostrou-se o maior promotor do dano, sendo responsável pelas alterações no peso molecular e na conformação das proteínas irradiadas.

Os resultados do espectro de absorção na região ultravioleta mostraram a capacidade radioprotetora do álcool butílico terciário, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1 molar. Os semelhança entre os espectros de absorção das amostras de veneno nativo, incubadas com diferentes concentrações desse "scavenger", indicam que a radioproteção foi obtida pela interação "scavenger"-radical livre.

Nas cromatografias, em TSK, e eletroforeses, na presença e ausência de agentes redutores, ficou demonstrada a importância do radical hidroxila na promoção das alterações no peso molecular das proteínas, embora não tenha sido possível identificar uma concentração onde fosse obtida a radioproteção.

Os resultados da determinação da concentração proteica das amostras irradiadas na presença de "scavengers", aliados aos resultados do espectro de absorção, cromatografias e eletroforese, demonstraram que o álcool butílico terciário, na concentração de 2M, atuou como agente radiosensibilizador, promovendo precipitação das proteínas, aumentando a formação de agregados e induzindo a formação de

quebras nas proteínas. Cabe salientar que os controle de veneno nativo não mostraram alterações na concentração proteica e peso molecular, após incubação com os "scavengers", nas várias concentrações utilizadas.

Os resultados da determinação das atividades proteolítica, hemorrágica e edemaciante, indicam que a atenuação das mesmas não pode ser atribuída, exclusivamente, às alterações promovidas por ação do radical hidroxila, mas também por alterações causadas pelos elétrons hidratados. Por outro lado, a participação do radical hidroxila na atenuação da atividade coagulante, foi demonstrada pela total proteção conferida pelas concentrações de 1,5 e 2M de álcool butílico terciário às enzimas responsáveis por essa atividade.

Os níveis de radioproteção e as concentrações dos "scavengers", onde a proteção máxima foi obtida, não foram coincidentes para as atividades testadas, indicando que enzimas diferentes são responsáveis por essas ações.

A radiosensibilização das enzimas caseinolíticas e ausência de radioproteção das proteínas com atividade hemorrágica, induzida pela presença de 2 molar de álcool butílico terciário, pode ter sido decorrente da atenuação dessa atividade pela própria presença do álcool. Cabe salientar que os resultados da determinação das atividades enzimáticas e biológicas, das alíquotas de veneno nativo incubadas com as diferentes concentrações dos "scavengers"

utilizados, com exceção das descritas acima, foram iguais às da amostra nativa.

Pelas metodologias utilizadas e característica das amostras ("pool" de proteínas), não foi possível determinar o tipo de alteração que os elétrons hidratados induziram. Porém, diante dos trabalhos de Butler e colaboradores¹⁸ e Garrison⁴⁴, sugerimos que a atenuação das atividades proteolítica, hemorrágica e edemaciante possa também ter sido causada pela alteração de aminoácidos específicos, importantes na ligação enzima-substrato ou localizados no centro ativo das enzimas responsáveis por essas atividades.

Os resultados apresentados justificam a utilização da radiação gama como técnica de atenuação, visando a melhoria do processo de obtenção de imunógenos mais adequados à produção de soros hiperimunes e como ferramenta para estudos de estrutura e de aminoácidos relevantes nas funções proteicas.

VI- CONCLUSÕES

A partir da irradiação do veneno de *Bothrops jararaca*, nas condições e pelas metodologias utilizadas, podemos concluir que:

1- As doses de 500 e 1000 Gy não induzem alterações significativas nas propriedades bioquímicas, imunológicas e tóxicas.

2- A dose de 2000 Gy promove alterações bioquímicas, diminuição significativa das atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas, manutenção das propriedades antigênicas e da capacidade de induzir a produção de anticorpos com a mesma eficiência na neutralização de atividades biológicas e maior eficiência na neutralização da toxicidade, em relação aos induzidos pelo veneno nativo.

3- Nas doses de 3000 e 4000 Gy ocorrem modificações bioquímicas e tóxicas significativas. O veneno irradiado nessas doses mantém a capacidade de induzir a produção de anticorpos com a mesma eficiência na neutralização de atividade edemaciante, embora estes possuam menor capacidade neutralizante da atividade hemorrágica e toxicidade.

4- A dose de 2000 Gy deve ser utilizada no tratamento de venenos, visando a melhoria do processo de imunização, para obtenção de soros antibotrópicos.

5- O radical hidroxila é o responsável pela atenuação da atividade coagulante, alterações na estrutura, no peso molecular, além das alterações conformacionais, identificadas nas amostras irradiadas.

6- A atenuação das atividades proteolítica, hemorrágica e edemaciante do veneno de jararaca, foi decorrente da ação conjunta dos radicais hidroxila e elétron aquoso, durante o processo de irradiação.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001- 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.
- 002- ADAMS, G.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON, R.L. Selective free radicals reactions with proteins and enzymes: the inactivation of ribonuclease. *Radiat. Res.*, 49:290-299, 1972.
- 003- ADAMS, G.E. & POSENER, M.L. Free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of pepsin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 35(6):497-507, 1979.
- 004- AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P. & MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*, 23(6):877-885, 1985.
- 005- 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, 1987. 53p.

- 006- ANANTHANARAYANAN, V.S. & BIGELOW, C.C. Unusual difference spectra of proteins containing tryptophan. II Studies with proteins. *Biochemistry*, 8(9):3723-3728, 1969.
- 007- ARAGON-ORTIZ, F. & GUBENZEC, F. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 25:759-766, 1987.
- 008- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, 24(9):943-946, 1986.
- 009- AUNG-KHIN, M.; LWIN-OHN, K. & ZIN, T. Immunogenicity of the toxoid of Russell's viper venom. *The snake*, 12:45-53, 1980.
- 010- BARIDE, R.M.; JAIN, S.D. & GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J. Med. Res.*, 72:571-576, 1980.
- 011- 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.

- 012- BIEBER, A.L. Metal and non protein constituents in snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. *Snake venoms*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. v.52, ch.9, p.295-306.
- 013- BISBY, R.H.; CUNDAL, R.B.; ADAMS, G.E. & REDPAT, 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.
- 014- BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J.Toxicol-Toxin Reviews*, 7(2):121-209, 1988-1989.
- 015- BRAZIL, O.A. IN: CORBETT, C.E., ed. *Farmacodinâmica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. cap.71, p.1044-1074.
- 016- BRINKHOUS, K.M.; SMITH, S.V. & READ, M.S. Botrocetin and von Willebrand Factor. In: PIRKLE, H.; MARKLAND Jr, F.S., eds. *Hemostasis and Animal Venoms*. 1985. v.7, ch.28, p.377-398.
- 017- BUTLER, J.; HOEY, B.M. & SWALLOW, A.J. Radiation Chemistry. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, 83:129-175, 1987.
- 018- 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.

- 019- CALICH, V.L.G.; KIPNIS, T.L.; DIAS-DA-SILVA, W.; ALPER, C.A. & ROSEN, F.S. Brazilian snake serum and venom: studies of the alternative pathway and C₃ in man and serpent. *J. Immunol.*, 120:1767, 1978.
- 020- CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R. *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. New York, Academic press, 1980.
- 021- CARDOSO, J.L.L. & BRANDO, R.J. *Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento*. São Paulo, Editora Santos, 1982.
- 022- CHANDERKAR, L.P., GURNANI, S. & NADKARNI, G.B. The involvement of aromatic amino acids in biological activity of bovine fibrinogen as assessed by gamma-irradiation. *Radiat. Res*, 65(2):283-291, 1976.
- 023- CHEUNG, D.V.; PERELMAN, N.; TONG, D. & NIMMI, M.E. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules isolated alfa-chains, and crosslinked native fibers. *J. Biomed. Mat. Res.*, 24:581-589, 1990.
- 024- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11):1279-1303, 1991.

- 025- CHOI, S.C. *Introductory applied statistics in science*. Englewood Chiffs, N.J., Prenticehall, 1978.
- 026- COSTA, L.M.; TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; BERRA, J.A.P.; ADELINO, M.G.F.; SOERENSEN, B.; PINTO, J.R. & VANCETTO, M.D.C. Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, "in natura", tratado com formaldeído e submetido à ação térmica. *Vacinas e soros*, 1:24-29, 1985.
- 027- COSTA, T.A. *Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de Crotalus durissus terrificus*. Sao Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 028- CREIGHTON, T.E. Disulphide bonds and protein stability. *BioEssays*, 8(2):57-63, 1988.
- 029- CZAPSKI, G. & ILAN, Y. On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical can the HABER-WEISS reaction be the source of OH[•] radicals? *Photochemistry and Photobiology*, 28:651-653, 1978.
- 030- CZAPSKI, G. On the use of OH[•] scavengers in biological systems. *Israel J. Chem.*, 24:29-32, 1984.
- 031- DENSON, K.W.E. & ROUSSEAU, W.E. Separation of coagulant components of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 8:15-18, 1970.

- 032- DENSON, K.W.E. Coagulant and anticoagulant action of snake venoms. *Toxicon*, 7:5-11, 1969.
- 033- DENSON, K.W.E.; RUSSEL, F.E.; ALMAGRO, D. & BISHOP, R.C. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. *Toxicon*, 10:557-562, 1972.
- 034- DERTINGER, H. & JUNG, H. The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. In: DERTINGER, H. & JUNG, H., eds. *Molecular Radiation Biology*. Berlin, Springer-Verberg, 1970. ch.9, p.115-133.
- 035- DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: BUCHERL, W. & BUCKELY, E.E. *Venomous Animals and their venoms*. DELOFEU, V., ed. Academic Press. New York, 1971, v.1, ch.6, p.119-165.
- 036- DIAS-DA-SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STHEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan*, 51(4):153-168, 1989.
- 037- DRAGANIC, I.G. & DRAGANIC, Z.D. *The radiation chemistry of water*. New York, Academic, 1971.
- 038- FARRAGI, M.; KLAPPER, M.H. & DORFMAN, L.M. Fast reaction kinetics of one-eletron transfer in proteins. The

- histidyl radical. Mode of electron migration. *J. Phys. Chem.*, 82(5):508-512, 1978.
- 039- FERREIRA, S.H. A bradykinin - potentiating fator (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Brit. J. Pharmacol.*, 24:163-169, 1965.
- 040- FERREIRA, S.H. & ROCHA E SILVA, M. Potenciação de polipeptídeos (Bradicinina, Angiotencina, Ocitocina, etc) por um fator presente no veneno da *B.jararaca*. *Ciência e Cultura*, 15(4):276, 1963.
- 041- FLOWERS, H.H. Effects of X-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* (Cottonmouth mocassin) venom. *Toxicon*, 3:302-304, 1966.
- 042- FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTÔNIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*, 29(2):219-226, 1991.
- 043- FURUKAWA, Y. & HAYASHI, K. Factor X converting and trombin-like activities of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 15(2):107-114, 1977.
- 044- GARRISON. W.M. Reaction mecanismos in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.*, 87:381-398, 1987.

- 045- GENÉ, J.A; GOMES, M.; GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L.
Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23:1015-1018, 1985.
- 046- 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.
- 047- 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.
- 048- 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.
- 049- GREENSTOCK, C.L. Oxy-radicals and the radiobiological oxygen effect. *Israel J. Chem.*, 24(1):1-10, 1984.
- 050- GROSCH, D.S. & HOPYWOOD, L.E. *Biological effects of radiation*. 2nded. New York, Academic Press., 1979.
- 051- GROTTO, M.; MOROZ, C.; de VRIES, A. & GOLDBLUM, N. Isolation of *Vipera palestinae* hemorrhagin of and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 133:356, 1967.

- 052- 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. But.*, 51(3):85-90, 1989.
- 053- GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G. & CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23 :887-892, 1985.
- 054- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, 51(4):211-223, 1989.
- 055- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G. & CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new costa rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon*, 25(7):713-720, 1987.
- 056- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. & CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85c:171-175, 1986.

- 057- HAJÓS, G.Y. & DELLINCÉE, H. Structural investigation of radiation-induced aggregates of ribonuclease. *Int. J. Radiat. Biol.*, 44(4):333-342, 1983.
- 058- HART, E.J. & ANBAR, M. *The hydrated electron*. New York, Wiley-Interscience, 1970.
- 059- 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.
- 060- HATI, R.N.; MANDAL, M. & HATI, A.K. Active immunization of rabbit with gamma irradiated russell's viper venom toxoid. *Toxicon*, 28(8):895-902, 1990.
- 061- 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. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Toxinas Protéicas: Anais do XII Simpósio Anual, sobre...realizado em Campinas, 1988*. Campinas, 1988. v.57-II, p.55-56.
- 062- HENRIKSEN, T. Effect of the irradiation temperature on the production of free radicals in solid biological compounds exposed to various ionizing radiations. *Radiat. Res.*, 27:694-709, 1966.

- 063- HENRIQUES, O.B.; FICHMAN, M. & HENRIQUES, S.B. Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem. J.*, 75:551-556, 1960.
- 064- HERRERA, Y.; YARLEQUE, A.; CAMPOS, S.Y. & ZAVALETA, A. Efecto de la radiacion gamma sobre la actividad biologica y propiedades enzimaticas de los venenos de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Informe Nuclear*, 3(1):1-14, 1986.
- 065- 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.
- 066- HOFFMAN, M.Z. & HAYON, E. Pulse radiolysis study of sulphhydryl compound in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, 77(8):990-996, 1973.
- 067- HOGE, A.R. & ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil - 2ª edição. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:373-499, 1978/79.
- 068- HOHN-ELKARIM, K.; MUHLENSIEPEN, H.; ALTMAN, K.L. & FEINENDEGEN, L.E. Modification of effects of

radiation on thymidine kinase. *Int. J. Radiat. Biol.*,
58(1):97-110, 1990.

- 069- HOMMA, M. & TU, A.T. Morphology of local damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Pathol.*, 52:538-542, 1971.
- 070- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Springer - Verlag, 1979. v.52, ch.4, p.61-158.
- 071- JONAH, C.D.; MATHESON, M.S.; MILLER, J.R. & HART, E.J. Yield and decay of the hydrated electron from 100ps to 3ns. *J. Phys. Chem.*, 80:1267-1270, 1976.
- 072- JONAH, C.D. & MILLER, J.R. Yield and decay of the OH radicals from 200ps to 3ns. *J. Phys. Chem.*, 81:1974-1976, 1977.
- 073- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. *Experimental Immunochemistry*. 2nded. Springfield Ill, Charles C.Thomas. (S.D.).
- 074- KAISER, E. & MICHEL, H.- Chemistry of pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. & DELOFEU, V., eds. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic. Press Inc., 1971. v.2, ch.32, p.307-318.

- 075- KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.; HUTTON, R.A.; RUGMAN, F.P.; WARREL, D.A. & HAY, C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*, 29(8):961-972, 1991.
- 076- KAMIGUTI, A.S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I.S. & NAHAS, L. Alteration of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 19:199-204, 1986.
- 077- KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; DESMOND, H. & HUTTON, R.A. Systematic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 29(9):1097-1105, 1991.
- 078- KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.C. & GAITONDE, B.B. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom of biomedical application. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiosterilization of Medical Products and Biological tissue: proceeding of the Symposium on... held in Bombay, dec. 9-13, 1974*. Vienna, 1975. p.253-261.
- 079- KENNEDY, A.R.; TROLL, W. & LITTLE, J.B. Role of free radicals in the initiation and promotion of radiation transformation "in vitro". *Carcinogenesis*, 5(10):1213-1218, 1984.

- 080- 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.
- 081- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. & OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 13:43-51, 1960.
- 082- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30:291-310, 1947.
- 083- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227:680-685, 1970.
- 084- LAUHATIRANANANDA, P.; GANTHAVORN, S. & HAYADOM, 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.
- 085- LOMAN, H.; VOOGD, S. & BLOK, J. Indirect radioprotection by sulfhydryl compounds: a model chemical system. *Radiat. Res.*, 42:437-445, 1970.

- 086- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revta. Biol. Trop.*, 31(1):37-40, 1983.
- 087- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- 088- MAGEE, J.L. & CHATTERJEE, A. Spur unfolding model for the radiolysis of water. *Radiat. Phys. Chem.*, 15:125-132, 1980.
- 089- MANDELBAUM, F.R.; CARRIJO, M. & HENRIQUES, S.B. Proteolytic activity of *Bothrops* protease A on the B chain of oxidized insulin. *Bioch. Biophys. Acta*, 132:508-511, 1967.
- 090- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Hemorrhagic factors from venoms of two species of *Bothrops* snakes. In: ACIESP. *Toxinas protéicas: anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre ... realizado em Campinas, 1988*. Campinas, 1988. Pub.57-I, v.1, p.9-14,
- 091- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 20(6):955-972, 1982.

- 092- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K. & SAWAI, Y., eds. *Animal, Plant and Microbial Toxins*. Plenum Press, London, 1976. v.I, p.111-121.
- 093- MANDELBAUM, F.R.; SERRANO, S.M.T.; SAKURADA, J.K.; RANGEL, H.A. & ASSAKURA, M.T. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *Crotalinae* e *Viperinae* subfamilies. *Toxicon*, 27(2):169-177, 1989.
- 094- MARCIANI, D.J. & TOLBERT, B.M. Structural damage in irradiated lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 351:387-395, 1974.
- 095- MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; SANO-MARTINS, I.S.; CHUDZINSKI, A.M.; SANTORO, M.L.; MORENA, P; TOMY, S.C.; ANTONIO, L.C.; MIHARA, H. & KELEN, E.M.A. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thrombosis and Haemostasis*, 63(3):449-453, 1990.
- 096- MATHESON, M.S. & RABANI, J. Pulse radiolysis of aqueous hydrogen solutions. I. Rate constants for reaction of e^- aq with itself and other transients. /II./ The

interconvertibility of e^- aq and H^1 . *J. Phys. Chem.*,
69:1324-1335, 1965.

097- Mc LENNAN, G.; OBERLEY, L.W. & AUTOR, A.P. The role of oxygen-derived free radicals in radiation-induced damage and death of nondividing eucaryotic cells. *Radiat. Res.*, 84:122-132, 1980.

098- MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, 31(1-6):964, 1959.

099- MONBOISSE, J.C.; GARDES-ALBERT, M.; RANDOUX, A.; BOREL, J.P. & FERRADINI, C. Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 965:29-35, 1988.

100- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. & TU, A.T. Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 253:108, 1987.

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

102- MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G. & THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of

- myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 29(6):713-723, 1991.
- 103- MURATA, Y. *Efeitos da radiação gama no veneno de Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares).
- 104- MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H.G.; DIAS da SILVA, W. & ROGERO, J.R. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but not affect their immunogenic activities. Abstract. *Toxicon*, 28(6):624, 1990.
- 105- NAGATA, C. & YAMAGUCHI, T. Electronic structure of sulfur compounds and their protecting action against ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 73:430-439, 1978.
- 106- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. & BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X - Activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombosis and haemostasis*, 2(41):314-328, 1979.
- 107- NASCIMENTO, N. *Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos*. São Paulo, 1991 (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

- 108- NAYAR, G.N.A. & SRINIVASAN, S. The effects of gamma radiation on solution of acetylcholinesterase. *Radiat. Res.*, 64:657-661, 1975.
- 109- NETO, P.L.O.C. *Estatística*. São paulo, Editora Edgard Blucher , 1977.
- 110- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. *Snake Venoms*. Berlin, Springer-Verlab, 1979. v.52, ch.9, p.480-546.
- 111- OKONOGI, T.; HATTORI, Z.; OGISO, A. & MITSUI, S. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, 17: 524-527, 1979.
- 112- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy*, 6(154):30-90, 1962.
- 113- OUYANG, C.; TENG, C.M. & HUANG, T.F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Asia Pacific J. Pharm.*, 2:169-179, 1987.
- 114- OVADIA, M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palestinae*. *Toxicon*, 16:479-487, 1978.

- 115- OWNBY, C. L.; COLBERG, T.R. & ODELL, G.V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*, 22 (2):227-233, 1984.
- 116- 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.
- 117- PURANANANDA, C. *Studies of effects of radiation on snake venoms with special aspects on their sterilization*. IAEA - r-661- F.- 1972.
- 118- 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.
- 119- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23(2):341-345, 1985.
- 120- QUEIROZ, L.S. ; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Ultrastructural changes in skeletal muscle capillaries caused by *Bothrops*

- jararaca* venom and two of its fractions. Abstract. *Toxicon*, 23:603, 1985.
- 121- RAY, A.A., ed. *SAS user's guide; statistics*. 1982 edition. Cary, North Carolina, SAS Institute, 1982.
- 122- READ, M.S.; SHERMER, R.W. & BRINKHOUS, K.M. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:4514-4518, 1978.
- 123- REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. & MANDELBAUM, I.R. Biophysical properties and amino acid composition of *Bothrops* protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (*jararaca*). *Toxicon*, 21(3):421-427, 1983.
- 124- 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.
- 125- RIBEIRO, L.A. Comunicação pessoal.
- 126- RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo*, 44(4):143-145, 1989.

- 127- ROSENFELD, G. Reprinted from: MATTOS, A.G. *Emergências em Pediatria. - Acidentes por animais peçonhentos*. 2ª ed. São Paulo, Sarvier, 1967.
- 128- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E; DELOFEU, V., eds. *Venomous Animals and their Venoms*. New York, Academic press., 1971 v.2, ch.34, p.345-384.
- 129- ROSING, J.; ZWAAL, R.F.A. & TANS, G. Snake venom prothrombin activator. In PIERKLE, H.; MARKLAND Jr, F.S., eds. *Hemostasis and Animal Venoms*. 1985. v.7, ch.1, p.3-27.
- 130- ROTHSCHILD, A. & ROTHSCHILD, Z. Liberation of active substances by snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York, Springer. 1979. v.52, p.590-628.
- 131- SAIKI, M.; VASCONCELLOS, M.B.A.; ROGERO, J.R. & CRUZ, M.C.G. Analysis of brazilian snake venoms by neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, 151(2):271-276, 1991.
- 132- SALAFRANCA, E.S. Irradiated cobra (*Naja naja philippinens*) venom. *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.*, 24 (1):60, 1973.

- 133- SANDERS, W.E.; READ, M.S.; REDDICK, L.; GARRIS, J.B. & BRINKHOUS, K.M. Thrombotic Thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by Botrocetin. An animal model. *Laboratory Investigation*, 59(4):443-452, 1988.
- 134- SANCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A. & DINIZ, C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon*, 25:611-619, 1987.
- 135- SANNER, T. Transfer of radiation energy from macromolecules to sulfur compounds. A comparison between the trapping efficiency of a thiol and its corresponding disulfide. *Radiat. Res.*, 44:594-604, 1970.
- 136- SAWAI, Y. Vaccination against snake bite poisoning. In: LEE, C.Y. ed. *Snake Venoms*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. v.52, ch.23, p.881-897.
- 137- SCHVESSLER, H. & RERGET, A. Oxygen effect in the radiolysis of protein I. Lactate Dehydrogenase. *Int. J. Radiat. Biol.*, 37(1):71-80, 1980.
- 138- SCHWARZ, H.A. Application of the spur diffusion model to the radiation chemistry of aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 75(6):1928-1936, 1969.

- 139- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; De SOUZA, G.E.P. & GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, 28(3):261-273, 1990.
- 140- SINGH, A. & SINGH, H. Time-scale and nature of radiation biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Biophys. Molec. Biol.*, 39:69-107, 1982.
- 141- SKALKA, M. & ANTONI, F. Effect of radiation on the biological properties of protein. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation Sensitivity of toxins and Animal Poisons: symposium on...held in Bangkok, May 19-22, 1969*. Vienna, 1970.
- 142- 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.
- 143- SPIERKEMAN, A.M.; FREDERICKS, K.K.; WAGNER, F.W. & PRESCOTT, J.M. Leucostoma peptidase A: A metalloprotease from snake venom. *Biochim. Biophys. Acta.*, 293:464- 475, 1973.
- 144- 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.

- 145- SWALLOW, A.J. Some biochemical processes induced by radiation as studied by pulse radiolysis. *Israel J. Chem.*, 10(6):999-1010, 1972.
- 146- SWEET, J.P. & THOMAS, J.K. Absolute rate constants for H atom reactions. *J. Phys. Chem.*, 68:1363-1368, 1964.
- 147- TANIZAKI, M.M.; ZINGALI, R.B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S. & SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, 27(7):747-755, 1989.
- 148- TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, 8:225-233, 1970.
- 149- 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.
- 150- THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. W. Org.*, 61(6):949-996, 1983.

- 151- THOMAS, J.K. Rate of reaction of the hydroxyl radicals.
Trans. Faraday Soc., 61:702-707, 1965.
- 152- THOMAS, J.K.; RABANI, J.; MATHESON, M.S.; HART, E.J. &
GORDON, S. Absorption spectrum of the hydroxyl
radicals. *J. Phys. Chem.*, 70:2409-2410, 1966.
- 153- TOWBIN, H. & GORDON, J. Immunoblotting and dot
immunobinding: Current status and outlook. *J. Immunol.
Meth.*, 72:313-340, 1984.
- 154- TREBIEN, H.A. & CALIXTO, J.B. Pharmacological
evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops
jararaca* venom. *Agents and actions*, 26(3-4):292-300,
1989.
- 155- TU, A.T.; Hemorrhagic proteases from snakes venoms.
In: PIRKLE, H; MARKLAND Jr, F.S., eds. *Hemostasis and
Animal Venoms*. 1985. v.7, ch.31, p.425-443.
- 156- TU, A.T.; HOMMA, M.; KONG, B.S. & TERRIL, J.B.
Neutralization of rattlesnake venom toxicities by
various compounds. *J. Clin. Pharm.*, 10(5):323-329,
1970.
- 157- VIEIRA, E.G.J.; ROLIM-ROSA, R.; IIZUKA, H.; FURTADO,
M.F.D. & FERNANDES, W. Influências sazonal e do
processo de extração sobre a produção, toxicidade do
veneno e sobrevida de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824).
Mem. Inst. Butantan, 50 (11):29-35, 1988.

- 158- VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:311-323, 1978/79.
- 159- WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.*, 244(16):4406-4412, 1969.
- 160- WHO. *Progress in characterization of venoms and standardization of antivenom*. Geneva, 1981. (WHO offset Publication 58).
- 161- WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P. & HANCOCK, R. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.*, 118:197-203, 1981.
- 162- YARLEQUE, C.A. *Influence of gamma radiation on the biological activity of snake venoms in Peru*. IAEA/ Research Contratct 3355/ R2/ RB, 1986.
- 163- YARLEQUE, C.A. *Influence of gamma radiation on the biological activity of snake venoms in Peru (Third part)*. IAEA/ Research Contratct 3355/ R2/ RB, 1986.
- 164- ZINGALI, R.B.; FRANCISCHETTI, I.M.; CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. Biochemical and pharmacological

screening of snake (*Bothrops*) venoms:
characterization of components acting on blood
coagulation and platelet aggregation. *Brazilian J.
Med. Biol. Res.*, 21:763-765, 1988.