

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO MORFOCITOLÓGICO COMPARATIVO DE
CROTOXINA NATIVA E IRRADIADA EM TECIDOS
E CÉLULAS DE CAMUNDONGOS CBA/J

BRUNO ANDRADE CARDI

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

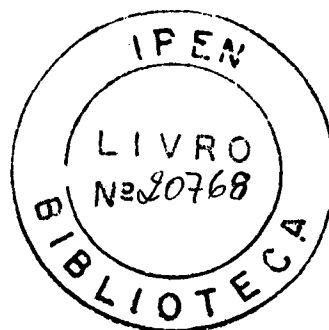
Orientador:
Dr. Heitor Franco de Andrade Jr

São Paulo
1995

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

**ESTUDO MORFOCITOLÓGICO COMPARATIVO DE CROTOXINA
NATIVA E IRRADIADA EM TECIDOS E CÉLULAS DE
CAMUNDONGOS CBA/J**

BRUNO ANDRADE CARDI



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

Orientador: Dr. Heitor Franco de Andrade Jr

SÃO PAULO

1995

Dedico este trabalho aos meus pais, pela confiança silenciosa e ao meu orientador pela liberdade e inteiro apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero, orientador inicial deste trabalho, pelo intenso interesse e pela confiança e presteza dispensados.

Ao Dr. Antônio Sesso pela orientação nas técnicas de microscopia eletrônica, bem como na liberdade de acesso ao seu laboratório na Faculdade de Medicina - USP.

À Dra Monamaris Marques Borges, pelo auxílio e sugestões nos ensaios envolvendo macrófagos.

À Nanci do Nascimento, não somente pela amizade e companheirismo, como também pelo auxílio científico e sugestões pertinentes.

À Dra Maria Antonieta Longo Galvão da Silva e Dra Vânia Caira Borghi, pelas valiosas sugestões quando do Seminário de Área.

Aos amigos do Grupo de Venenos do IPEN, em especial a Regina Aparecida de Paula e Patrícia Bianca Clissa, pela presteza no fornecimento de reagentes indispensáveis.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia, que me proporcionaram uma excelente convivência no decorrer do desenvolvimento do meu trabalho naquele laboratório.

À Carla Pagliari, do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, pelo auxílio inicial nos ensaios imunohistoquímicos.

À Creusa F.C.Takakura, Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, pelo auxílio nas preparações imunoeletrônicas.

À Regina Aparecida Leal, técnica do Laboratório de Protozoologia, pelo auxílio nos ensaios com células.

Às técnicas do Departamento de Histologia da Faculdade de Medicina - USP, em especial a Margarida e Cristina, pelo auxílio na confecção do material histológico.

Ao amigo Patrick Jack Spencer pelo companheirismo e idéias construtivas durante a execução deste trabalho.

Ao amigo Norival Kesper Júnior pelo auxílio nas preparações eletroforéticas.

Ao amigo Jaime Aparecido Bertoluci, pelas sugestões, apoio no decorrer do trabalho e correção deste manuscrito.

A Almir R. Ferreira pelos imprescindíveis trabalhos fotográficos.

Aos Diretores do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela possibilidade de utilização da infra-estrutura dos laboratórios deste Instituto.

A Supervisão de Radiobiologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN-SP, pelo suporte institucional.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Patologia, pela utilização de técnicos e materiais, na execução do presente trabalho.

À CAPES,
pelo financiamento desta Dissertação sob a forma de Bolsa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Um homem aterrorizado por quatro serpentes de veneno mortal, por cinco inimigos que matam, por um sexto assassino, um ladrão, por bandidos que saqueiam as aldeias mesmo abandonadas, ele se precipita para aqui e para ali. Ele poderia ver uma vasta extensão de água; a margem de cá, repleta de perigos; a margem de lá, segura e sem torrentes; mas nenhum barco pode transportá-lo, nenhuma ponte para atravessar do não além para o além. Vendo isso, ele pensaria: "Se eu reunisse ervas, gravetos, ramos, folhagens, se eu construísse uma balsa, se eu fosse para lá com segurança, agitando braços e pernas, e me fiando em minha balsa?"

Ele então age assim e passa para o lado de lá, atingindo a terra firme.

Parábola da Balsa - DRAMA

ÍNDICE

Tema	Página
I- INTRODUÇÃO	1
1- O Veneno Crotálico	1
2- A Crotoxina	3
3- A Radiação Ionizante	6
II- OBJETIVOS	10
III- MATERIAIS E MÉTODOS	11
1- Materiais	11
1.1- Reagentes Gerais	11
1.2- Veneno Total de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	11
1.3- Crotoxina	11
1.4- Fixador para Microscopia Óptica	11
1.5- Fixador para Microscopia Eletrônica	11
1.6- Animais Experimentais	12
2- Métodos	12
2.1- Irradiação de veneno total e crotoxina purificada	12
2.2- Determinação de Toxicidade da Crotoxina Nativa	12
2.3- Conjugados e Reagentes Específicos Utilizados	13
2.3.1- Produção de IgG Anti-Crotoxina conjugada a Peroxidase	13
2.3.2- Biotinilação de IgG de coelho Anti-Crotoxina Nativa (CJ1)	14
2.3.3- IgG (Cabra) Anti-IgG de Coelho conjugada com Ouro coloidal (CJ2)	14
2.3.4- Complexo Avidina Biotina Peroxidase (ABC)	14
2.3.5- Cromógeno para Revelação em Microscopia Óptica	14
2.4- Caracterização das Amostras de Venenos, Toxinas e Anticorpos	15
2.4.1- Determinação de Concentração Protéica	15
2.4.2- Titulação do Anticorpo Primário (CJ1)	15
2.4.3- Titulação do Anticorpo Secundário (CJ2)	16
2.4.4- Grau de Pureza e Reatividade de Amostras e Conjugados	16
2.4.4.1- EGPA-SDS	16
2.4.4.2- Western Blotting	17
2.5- Modelos Experimentais	18
2.5.1- Modelo de Envenenamento Agudo <i>in vivo</i>	18
2.5.1.1- Análise Estrutural	18
2.5.1.2- Análise Ultraestrutural	18
2.5.1.3- Histologia e Imunohistoquímica	19
A- Microscopia Óptica	19

B- Imunoeletrônica	19
2.5.2- Modelo <i>in vitro</i>	20
2.5.2.1- Macrófagos Peritoneais, obtenção	20
2.5.2.2- Ensaio Imunohistoquímico	21
IV- RESULTADOS	22
1- Caracterização das amostras de Venenos, Toxinas e Anticorpos	22
1.1- Concentração Protéica	22
1.2- Titulação do Anticorpo Primário (CJ1)	22
1.3- Titulação do Anticorpo Secundário (CJ2)	22
1.4- Grau de Pureza e Reatividade de Amostras e Conjugados	22
1.4.1- EGPA-SDS	22
1.4.2- Western Blotting	25
2- Modelos Experimentais	25
2.1- Modelo de Envenenamento Agudo <i>in vivo</i>	25
2.1.1- Análise Estrutural	25
2.1.1.1- Crotoxina Nativa ou irradiada	25
2.1.1.2- Veneno Total Nativo ou Irradiado	28
2.1.2- Análise Ultra-estrutural e Imunoeletrônica	28
2.2- Modelo <i>in vitro</i>	35
2.2.1- Aspecto geral dos macrófagos após ensaio	35
2.2.2- Ensaio Imunohistoquímico	42
2.2.2.1- Crotoxina Nativa ou Irradiada	42
2.2.2.2- Veneno Total Nativo ou Irradiado	42
V- DISCUSSÃO	48
VI- CONCLUSÕES	55
1- Gerais	55
2- Específicas	55
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

SUMMARY

COMPARATIVE MORPHOCYTOLOGIC STUDY OF NATIVE AND IRRADIATED CROTOXIN ON CBA/J MICE TISSUES AND CELLS.

BRUNO ANDRADE CARDI

Snake venoms submitted to gamma irradiation are better immunogens, have less toxic activity and maintain immunogenic and antigenic properties, favouring its use in anti-sera production, main therapy in human accidents. Severe human accidents, attributed to neurotoxicity of the venom, are caused by *Crotalus durissus terrificus*, which main toxin, crotoxin, acts on neuromuscular junctions, as detected by electrophysiological studies and could be detoxified by gamma irradiation. In order to evaluate the biological role of this irradiated protein, we analyzed, at morphological and immunohistochemical level, organs and cells from CBA/J mice challenged with crude venom or purified crotoxin, in an acute envenomation model. Both toxins were submitted to 2000 Gy irradiation in a ^{60}Co source, in water solution. For crotoxin detection, we used a anti-crotoxin policlonal antibody induced in horses or rabbits, whose titer and specificity were determined by ELISA and Western Blot, revealed in immunohistochemistry by secondary conjugates with peroxidase or colloidal gold. In muscle from CBA/J mice, an acute time dependent process could be observed on neuromuscular junctions affected by non-irradiated crotoxin, which were not observed with irradiated crotoxin, showing its low affinity to specific receptors at this level. Clearance organs, liver and kidney, presents toxins detected by immunohistochemistry but no morphological changes could be attributed to toxins action. When crude venom was used, the same results were found.

When isolated cells, peritoneal macrophages, were assayed with toxins in an *in vitro* model, we could detect, by immunohistochemistry, a preferential uptake of irradiated crotoxin by the cells, comparatively to other samples. The presence of high molecular weight protein aggregates induced by irradiation, would explain this behavior.

This results disclose that irradiated crotoxin could be detected on clearance organs but not in neuromuscular junctions, the toxicity target of non-irradiated toxin. We could also demonstrate that the irradiation process induces changes that enhances the uptake of irradiated toxin to macrophages, probably favouring immune reactions, as antibody production. These conditions qualify irradiated crotoxin as better immunogen in experimental or commercial immunization schedules.

RESUMO

ESTUDO MORFOCITOLÓGICO COMPARATIVO DE CROTOXINA NATIVA E IRRADIADA EM TECIDOS E CÉLULAS DE CAMUNDONGOS CBA/J

BRUNO ANDRADE CARDI

Os venenos ofídicos submetidos a radiação gama tornam-se melhores imunógenos pela diminuição de sua atividade tóxica e manutenção de suas propriedades imunogênicas e antigênicas, favorecendo seu uso na produção de anti-soros, principal tratamento em acidentes ofídicos humanos. Os acidentes com maior incidência e letalidade pela ação neurotóxica do veneno são causados por *Crotalus durissus terrificus*, cuja toxina principal, a crotoxina, apresenta ação sobre junções neuromusculares detectável eletrofisiologicamente, sendo passível de destoxicação pela radiação gama. Para avaliar o comportamento biológico desta proteína irradiada, analisamos, morfológica e imunohistoquimicamente, órgãos e células isoladas de camundongos CBA/J desafiados com veneno crotálico total ou crotoxina purificada em modelo de envenenamento agudo. As toxinas foram utilizadas nas suas formas nativa ou irradiada a 2000Gy em solução aquosa em uma fonte de ^{60}Co . Para a detecção da crotoxina, utilizamos anticorpos policlonais produzidos em coelhos ou em cavalos, que tiveram seus título e especificidade avaliados por ensaios imunoenzimático e "Western blot", com revelação imunohistoquímica através de anticorpos conjugados a peroxidase ou ouro coloidal. Em músculos de camundongos CBA/J, um processo agudo e tempo-dependente pode ser observado em junções neuromusculares afetadas por crotoxina não irradiada, que não foi visto com a forma irradiada, mostrando a sua baixa afinidade por receptores específicos a este nível. Os órgãos de clareamento, fígado e rim, apresentaram detecção imunohistoquímica das toxinas, mas nenhuma alteração morfológica foi encontrada ou atribuída à ação das toxinas. Quando veneno total foi utilizado, os mesmos resultados foram observados.

Quando células isoladas, macrófagos peritoneais, foram ensaiados com as toxinas, num modelo *in vitro*, pudemos detectar, imunohistoquimicamente, um reconhecimento preferencial, por parte das células, da forma irradiada da crotoxina, comparativamente às demais amostras. A presença de agregados protéicos de alto peso molecular, induzidos pela radiação, pode explicar este comportamento.

Esses resultados mostram que a crotoxina irradiada pode ser detectada em órgãos de clareamento, mas não em de junção neuromuscular, principal alvo de ação da crotoxina não irradiada. Pudemos também demonstrar que o processo de irradiação induz alterações na molécula de crotoxina, aumentando sua captação por parte de macrófagos, provavelmente favorecendo reações imunes, como a produção de anticorpos. Essa condições qualificam a crotoxina irradiada como melhor imunógeno em protocolos de imunização, experimentais ou comerciais.

I-INTRODUÇÃO

1- O VENENO CROTÁLICO

As serpentes formam a subordem Ophidia ou Serpentes, que se encontra inclusa na Ordem Squamata da "Classe" Reptilia do Filo dos Chordata. Cerca de 3300 espécies são conhecidas no mundo, distribuídas em 11 famílias, sendo que 5 (Elapidae, Hydrophiidae, Colubridae, Atractaspididae e Viperidae) concentram as serpentes produtoras de secreções tóxicas. A morfofisiologia do aparato de veneno varia de acordo com a família de serpente, demonstrando diferenças evolutivas entre as mesmas. Entretanto, o objetivo final da existência desse aparato parece ser a aquisição de alimento e defesa⁸⁵.

Os venenos de serpentes são misturas complexas contendo altas concentrações de proteínas¹²¹, muitas delas com propriedades tóxicas. Algumas dessas proteínas e peptídeos vêm sendo purificados e suas propriedades determinadas, como a composição de aminoácidos, a estrutura primária de numerosas neurotoxinas, inibidores enzimáticos e outros⁶⁹ mostrando, também, haver diferenças no que se refere a composição dos venenos nas diferentes famílias de serpentes¹²¹. Diferenças na composição dos venenos num mesmo gênero ou espécie de serpente também são encontradas quando se analisa a distribuição geográfica, idade e hábitos alimentares dos animais^{71,85,86,125,126}.

No Brasil, as serpentes consideradas de importância médica estão agrupadas, na sua maioria, na família Viperidae, sub-família Crotalinae, cujas espécies são representadas pelos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, etc), *Lachesis* (surucucus), *Crotalus* (cascavéis) e na família Elapidae, sub-família Elapinae, as corais verdadeiras (gênero *Micrurus*)⁶⁵.

O gênero *Crotalus* é representado apenas por uma espécie, *Crotalus durissus*, que se distribui pela maioria das regiões do país, sendo menos abundante na região norte^{4,65} e apresentando 6 subespécies bem caracterizadas, a saber, *C.d.cumanensis*, *C.d.cascavella*, *C.d.ruruima*, *C.d.marajoensis*, *C.d.colililineatus* e *C.d.terrificus*. A subespécie *C.d.terrificus* distribui-se pela Bolívia, Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil (MG, SP, SC, PR, RS, MT e MS)⁶⁵ e é responsável por cerca de 10% dos acidentes ofídicos do sudeste brasileiro, com o maior índice de mortalidade^{106,140}.

Na clínica, observa-se um quadro predominantemente neurotóxico e miotóxico, seguido de sinais e sintomas atribuídos à atividade coagulante do veneno^{5,72}. O quadro neurotóxico, geralmente evidente nas primeiras horas, se caracteriza por *fascies miastenica* (ptose palpebral uni- ou bilateral, diplopia,

oftalmoplegia com possível dificuldade de acomodação e anisocoria), tendo como manifestações menos freqüentes, a paralisia velatopalatina com dificuldade de deglutição e reflexo de vômito diminuído. O quadro miotóxico inicia-se, principalmente, com mialgia generalizada, sendo o escurecimento da urina (avermelhada ou marrom) uma conseqüência da liberação de pigmento respiratório muscular¹³, a mioglobina, sendo esse efeito a maior evidência de rabdomiólise^{11,12,18,34,35,83}. A análise dos níveis séricos de isoenzimas de creatinaquinase (CK) e desidrogenase láctica (LDH), juntamente com alterações focais observadas em biópsias de pacientes, levaram a hipótese de uma predileção, por parte do veneno, por fibras oxidativas do tipo I e/ou IIa³⁵, o que confirma os ensaios histoquímicos obtidos em dois pacientes biopsiados, onde se observou atrofia seletiva de fibras do tipo I⁷³. Essa mioglobinúria leva, muitas vezes, a um quadro de insuficiência renal aguda (IRA)³⁶, principal causa de óbito nos pacientes^{7,8,9}.

Foram também descritos quadros de sangramentos com incoagulabilidade do sangue⁶, tendo sido demonstrados defeitos da coagulação sangüínea em 30 a 50% dos pacientes, devido a existência de uma atividade trombina-símile do veneno, que pode produzir consumo de fibrinogênio¹⁰⁴. Observa-se ocorrência de sangramento leve, na maioria das vezes limitado à gengiva⁷⁴, muitas vezes tornando difícil o diagnóstico diferencial frente a acidentes botrópicos, principalmente quando espécimens jovens de *Bothrops jararaca* estão envolvidos, devido ao fato de seus venenos apresentarem atividade predominantemente coagulante¹⁰⁷.

Distúrbios respiratórios são raramente observados mas, quando presentes, podem ocorrer durante a primeira hora ou primeiro dia, ou secundariamente, 3 a 12 dias após a picada, em pacientes com IRA^{3,81}. Sinais no local da picada não são evidentes e, quando presentes, se resumem a edema, parestesia e/ou eritema discretos.

A subespécie *Crotalus durissus terrificus* vem sendo exaustivamente estudada, não somente por ser a principal responsável pelos acidentes crotálicos do sudeste brasileiro¹⁰⁸, como também por causa da composição de seu veneno, que encerra componentes farmaco-ativos, tais como a crotamina, convulxina, giroxina, delta-toxina e crotoxina.

A crotamina⁴⁷ consiste de um polipéptido fortemente básico (pm 4880), que apresenta atividade miotóxica¹³⁵ devido, principalmente, à sua ação sobre o funcionamento dos canais de sódio voltagem-sensíveis do sarcolema, o que leva à indução do influxo de sódio, resultando numa despolarização e contração do músculo esquelético^{28,29,46,96,138}. Neste, a crotamina produz lesões, que

consistem de necrose de fibras musculares caracterizada por uma extensa vacuolização do retículo sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina^{25,130}. Estudos acerca da seqüência primária da crotalina têm demonstrado que esta possui um alto grau de homologia com outras toxinas mionecrosantes^{17,43,82}.

A convulxina consiste de um polipéptido de alto peso molecular (72.000), produzindo uma rápida e profunda trombocitopenia quando inoculada intravenosamente em coelhos anestesiados. Esse achado demonstra a atividade estimulante específica sobre plaquetas, que induz a agregação das mesmas por um mecanismo aparentemente independente da ciclo-oxigenase e dependente de cálcio¹³¹. A ação sobre plaquetas leva a liberação de aminas bioativas, podendo produzir convulsões como resultado da formação de microêmbolos, com uma isquemia transitória subsequente ou uma liberação maciça de autacóides⁹⁹. Outros efeitos são hipotensão, alterações agudas do padrão respiratório^{134,137}, perda de equilíbrio, nistagmo, bem como distúrbios gastrointestinais^{98,134}.

A giroxina (pm 34.000) é uma toxina não letal que, em camundongos, provoca alterações características no equilíbrio, demonstradas por movimentos giratórios em torno do eixo longitudinal corpóreo estando, porém, ausente o quadro de nistagmo. Os efeitos podem aparecer cerca de 3 minutos após a inoculação, ocorrendo a recuperação ao final de aproximadamente 60 minutos. A resposta parece não ser dependente da dose, mas sim do tipo "tudo-ou-nada" mostrando taquifilaxia, que ocorre até 10 a 40 dias mais tarde^{15,116}.

A delta-toxina é um componente ainda pouco estudado, não se conhecendo bem os seus efeitos farmacológicos, sendo citada, apenas, a sua capacidade de alterar a permeabilidade vascular¹³⁵.

2- A CROTOXINA

A crotalina (pm 24.000, pl 4.7)⁸⁹ é o componente mais abundante e tóxico do veneno de *C.d.terrificus*¹⁸. Isolada pela primeira vez por Slotta e Fraenkel-Conrat em 1938¹¹⁹ demonstrou, a princípio, ser uma proteína homogênea^{50,79}. Entretanto, o tratamento do complexo com dinitrofluorobenzeno demonstrou dois derivados, um solúvel e outro insolúvel em água, os quais se mostravam bastante distintos quanto à composição de aminoácidos⁴⁴. Mais tarde, Hendon e colaboradores (1979)⁶³, utilizando agentes acilantes menos volumosos, confirmaram a presença de duas subunidades e indicaram a necessidade de ambas para que a neurotoxicidade ocorresse^{62A,113}. As duas subunidades foram denominadas, A e B.

A subunidade A, provavelmente derivada de uma fosfolipase A₂ não tóxica e homodimérica², também denominada crotapotina ou crotoxina A, é uma proteína ácida com ponto isoelétrico (pI) em torno de 3.8 e peso molecular 9.000¹¹³, composta de 3 cadeias, A, B e C, com 40, 34 e 14 aminoácidos, respectivamente, ligadas por pontes dissulfeto. Esta proteína não apresenta atividades enzimáticas ou farmacológicas detectadas até o momento, apenas comportando-se como carreadora da outra subunidade, o que possibilita uma ligação mais específica ao sítio específico para esta última, com conseqüente maior especificidade de ação^{18,22}. A análise da seqüência de aminoácidos da cadeia C da crotapotina mostra uma estreita homologia desta subunidade com neurofisinas, que são aceitas como sendo moléculas com função carreadora ligadas a hormônios neurohipofisários¹²¹.

A subunidade B (crotoxina B) consiste de uma enzima fosfolipase A₂ (PLA₂)(E.C. 3.1.1.4)²¹ cálcio-dependente²⁷, fortemente básica com pI em torno de 8.7 e peso molecular 15.000¹¹³. Esta possui grande homologia com outras PLA₂ não ofídicas, como determinado por cristalografia de raio X^{23,38,39}, embora existam, na análise detalhada da estrutura das cadeias, diferenças que permitem a diferenciação entre elas¹⁰⁵. Esta PLA₂ possui alta afinidade por lípidos carregados negativamente, o que possibilita, quando esta se encontra isolada do complexo crotoxina, a sua interação inespecífica com membranas biológicas que os contenham^{19,56,57}.

Além da sua atividade miotóxica evidente^{60,76}, a crotoxina apresenta uma ação pré-sináptica predominante em junção neuromuscular de musculatura estriada esquelética. A esse nível, quando em grandes quantidades, pode levar a uma ação caracteristicamente pós-sináptica, onde mantém os receptores de acetilcolina num estado conformacional inativo^{18,19,58,132,133,134,136}. Mesmo sendo esses efeitos reversíveis, a destruição de junções neuromusculares ocorre, como conseqüência da ação específica da PLA₂ sobre a camada lipídica da porção pré-sináptica, o que já foi demonstrado por estudos morfológicos estruturais e ultra-estruturais^{26,48,49}.

No campo farmacológico, destacam-se os trabalhos de Vital-Brazil (1966)¹³³ e Vital-Brazil & Excell (1970)¹³² a respeito da ação neurotóxica periférica da crotoxina. Esses autores demonstraram a capacidade da crotoxina em bloquear a transmissão do impulso nervoso em nível de pré-sinapse e atribuíram a paralisia respiratória em cães inoculados com a toxina, a um fenômeno puramente periférico, visto não haverem encontrado a toxina nos centros respiratórios centrais. Estes achados são corroborados pelos de Lomba (1969)⁸⁰ que, usando crotoxina marcada com ¹³¹I, mostrou que esta não

ultrapassa a barreira hematoencefálica ou o faz em proporções ínfimas. Rodrigues-Simioni e colaboradores (1990)¹¹⁰, usando rãs, encontraram uma ação da crotoxina sobre junções neuromusculares, que se caracterizou por um efeito trifásico típico (depressão, facilitação e bloqueio final da liberação de neurotransmissor), sendo que as ações mais tardias já haviam sido atribuídas, por outros autores, a ação fosfolipásica da crotoxina^{61,62,123}.

Estudos relativos às alterações morfológicas ocorridas no envenenamento crotálico são restritos, principalmente a espécies do gênero *Crotalus* da América do Norte, que apresentam veneno com ações basicamente "proteolítica e coagulante", à semelhança das serpentes do gênero *Bothrops* do Brasil, sendo *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave Rattlesnake), uma das poucas exceções. A maioria destes estudos, quando experimentais, se restringe a abordagens limitadas e sob a luz da microscopia óptica. Entretanto, alguns trabalhos contribuíram para o esclarecimento das alterações ultra-estruturais do envenenamento crotálico.

Os estudos de microscopia eletrônica com veneno crotálico se iniciaram na década de 70, com os trabalhos de Ownby e colaboradores (1974)⁹³ e Ownby (1982)⁹² sobre a ação hemorrágica do veneno de *Crotalus atrox*. Nesses estudos, observou-se um efeito inicial de dilatação do espaço perinuclear e do retículo endoplasmático da células endoteliais. Mudanças subseqüentes incluíram a ruptura da membrana plasmática das células endoteliais, extravazamento de sangue e agregação de plaquetas. Os autores concluíram que a hemorragia era causada pela ação lítica direta do veneno sobre as células endoteliais, ou seja, hemorragia *per rexis*. Posteriormente, Ownby (1978)⁹⁴, utilizando toxina HTa purificada do mesmo veneno, observou, ultra-estruturalmente, que esta toxina possuía uma ação direta sobre as células endoteliais, resultando na lise de suas membranas plasmáticas, bem como em outras alterações.

Muitos autores têm relatado mionecrose após inoculação experimental de veneno de *Crotalus*. Dentre estes, estudando o efeito local induzido pelos venenos de 28 serpentes crotalídeas (9 do gênero *Crotalus*), Homma e Tu (1971)⁶⁶ observaram três tipos de necrose, a saber, coagulativa, miolítica e mista. O veneno de *C.d.terrificus* apresentou uma ação mista, a que os autores atribuíram a presença da crotoxina no veneno. Entretanto, ressaltaram que não existe uma necrose muscular que seja exclusivamente coagulativa ou miolítica, em se tratando de toxinas ou enzimas de venenos de serpentes.

O primeiro estudo ultra-estrutural sobre mionecrose produzida por venenos crotálicos foi feito por Stringer e colaboradores(1972)¹²². Foram investigados os

efeitos do veneno de *Crotalus viridis viridis* em músculo esquelético de camundongos três horas após a injeção intramuscular de 1/4 DL₅₀ do veneno. Foram observadas alterações no sistema tubular sarcoplasmático, bem como ruptura das bandas Z e, conseqüentemente, perda total da organização das miofibrilas. Utilizando miotoxina purificada do mesmo veneno, Ownby e colaboradores (1976)⁹⁵ demonstraram, por análise ultra-estrutural, uma série de eventos degenerativos das células musculares, tais como vacuolização produzida pela dilatação do retículo sarcoplasmático e espaço perinuclear.

A análise ultra-estrutural da ação da crotoxina sobre músculo esquelético foi feita por Gopalakrishnakone & Hawgood (1984)⁴⁸, através da injeção intramuscular, demonstrando degeneração de fibras musculares, que se iniciou seis horas após a inoculação, com completa necrose em 25 horas. Essa necrose foi interpretada como decorrente do aumento da concentração de cálcio intracelular, baseando-se na presença de grânulos de cálcio nas mitocôndrias de fibras degeneradas, o que corrobora os achados de Duncan (1978)⁴⁰ e Shanne e colaboradores (1979)¹¹⁵, que propuseram o aumento de cálcio intracelular como um fator necrosante celular. Os estudos acima citados apresentam algumas restrições devido à utilização de análise do local da injeção, ou seja, a musculatura estriada injetada diretamente, o que ocasiona uma grande concentração tissular de toxinas.

Rossi e colaboradores (1989)¹¹², utilizando material biopsiado de membro contralateral de indivíduos picados por *C.d. terrificus*, propuseram um mecanismo de miopatia, baseado numa ação sistêmica do veneno, tanto pelo efeito direto do mesmo sobre as células, quanto por isquemia da microvasculatura.

Experimentalmente, Nascimento (1991)⁸⁹ observou que a ¹²⁵I-crotoxina apresentava retenção de até 3 horas em musculatura estriada esquelética, apesar de sua concentração ser menor nesse sítio quando comparada aos demais órgãos analisados. Quanto à excreção, a crotoxina detectada no rim e em órgãos do sistema fagocítico mononuclear (fígado e baço), mostrando que esses órgãos participam do clareamento da toxina.

3- A RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação ionizante consiste de ondas eletromagnéticas formadas a partir de transições nucleares, tendo alta energia, ausência de massa, bem como a capacidade de promover ionização e excitação nos meios, onde possui um alto poder de penetração⁵³. Os danos produzidos pela radiação podem ser diretos ou indiretos, sendo o primeiro uma conseqüência da interação imediata da energia

com o alvo molecular e o segundo, o resultado da interação secundária de espécies reativas produzidas pela radiação em outras moléculas do meio, principalmente quando da interação desta com a água. Assim, em células ou tecidos, a radiação produz danos que variam desde pequenas excitações até a morte celular. O tipo de dano dependerá, dentre outros fatores, da dose, da taxa de dose e do tipo de célula ou tecido. Assim, foi mostrado que algumas linhagens celulares apresentam maior radiosensibilidade que outras¹⁰², sendo que a morte dessas células geralmente ocorria por apoptose¹⁰³. Nos tecidos, não há dúvidas de que o DNA é o alvo crítico da radiação, podendo ser fragmentado por esta, o que consiste num pródromo da morte apoptótica ou necrótica^{101,124}. As células germinativas também consistem num alvo importante da ação da radiação, visto que esta pode produzir aberrações cromossômicas e mutações letais dominantes em oocistos de mamíferos, havendo diferenças entre esses quanto à sensibilidade, que pode variar com a espécie, fase meiótica e estágio do desenvolvimento folicular⁷⁰.

Além do DNA, outras moléculas podem ser alvo da radiação, tais como carboidratos, lípidos e proteínas. As alterações oriundas, principalmente, da interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas promovem desaminação, seja de aminoácidos aromáticos ou não aromáticos^{24,45}. Apesar desses efeitos ocorrerem ao acaso na molécula protéica, alguns sítios podem ser mais favoráveis, principalmente devido à transmissão de energia intramolecular⁴¹. Destruição de aminoácidos e rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica por agregação, são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer, levando a mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas^{1,37,45}. Existem evidências de uma diferença quanto a radiosensibilidade dessas várias funções biológicas, sendo que as propriedades imunológicas são as mais radioresistentes. Dessa forma, a radiação vem sendo utilizada na tentativa de produção de vacinas contra várias doenças¹³⁹. Nesse campo, podemos citar vários estudos que vêm sendo feitos utilizando-se esporozoítos de *Plasmodium* spp. irradiados, bem como mosquitos vetores infectados submetidos a radiação^{31,64,109}. Este tipo de estudo tem mostrado que a imunização de animais e humanos com a forma esporozoítica irradiada tem a capacidade de proteger esse indivíduos, quando estes são desafiados com esporozoítos normais (não irradiados). Entretanto, esta imunização não protege os indivíduos quando estes são desafiados com as formas merozoíticas ou eritrocitárias dos plasmódios⁹⁰.

Na tentativa de atenuar venenos ofídicos, vários métodos vêm sendo tentados, dentre eles, o calor³², a formalina^{52,84}, o glutaraldeído⁵⁵, o iodo¹⁶, a foto-oxidação na presença de azul de metileno¹¹⁷, o raio X⁴², a radiação ultravioleta¹²⁷ e outros. Entretanto, alguns desses métodos mostravam pouca ação sobre a toxicidade dos venenos ou comprometiam a antigenicidade e imunogenicidade dos mesmos. Dentre os métodos satisfatórios, a radiação gama se mostrou mais eficaz em destoxicar venenos totais^{54,87} ou frações isoladas, como a crotamina³³ e a crotoxina^{89,120}. A análise desta e de outras proteínas submetidas à ação da radiação gama, demonstra a sua eficiência como ferramenta na produção de melhores imunógenos, pois esta não adiciona novas moléculas à amostra protéica, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos^{51,55}, bem como aumenta a antigenicidade de muitas proteínas⁹¹.

A utilização desta técnica se justifica pelo fato de que a produção de soro hiperimune contra venenos animais depende da imunogenicidade de cada veneno e, no caso do veneno de *C.d.terrificus*, além da baixa capacidade imunogênica, este apresenta uma alta toxicidade devido aos seus componentes neurotóxicos. Este fato impede que doses adequadas possam ser administradas nos animais soroprodutores que, normalmente, já sofrem com a imunização usual, a qual utiliza uma mistura de venenos sem nenhum tratamento prévio⁵⁵.

Assim, a capacidade atenuante da radiação sobre a atividade tóxica, a preservação da imunogenicidade e antigenicidade, bem como uma produção satisfatória de anticorpos, indicam a radiação ionizante como ferramenta ideal na produção desses imunógenos.

Nascimento (1991)⁸⁹ descreveu a biodistribuição de ¹²⁵I-crotoxina nativa e ¹²⁵I-crotoxina irradiada em camundongos demonstrando não ter ocorrido qualquer tipo de retenção de crotoxina irradiada em órgãos de clareamento, mostrando uma ligação precoce desta em tecido renal. Os órgãos do sistema fagocítico mononuclear se mostraram importantes para ambas as formas, onde foi observada marcação nas primeiras horas. Com relação aos órgãos ricos em tecido nervoso (cérebro e músculo estriado esquelético), Nascimento observou uma menor concentração das toxinas, mas uma maior retenção das mesmas a esses níveis, chegando a 3 horas após a inoculação. Assim, a autora propõe que o clareamento renal, por filtração simples, ocorra para ambas as formas da toxina, salientando, entretanto, que a retenção observada para a crotoxina nativa poderia levar a um quadro de agressão renal. Por fim, a crotoxina teria uma maior afinidade, tanto por órgãos do sistema fagocítico mononuclear, através dos quais seria clareada conjugada a células, como por órgãos ricos em terminações nervosas, onde se ligaria a receptores específicos. Estes dados mostraram,

portanto, a ligação seletiva de crotoxina em três tipos de órgãos, mas não revelam a localização celular nem uma possível interação com grupos celulares específicos de cada órgão.

II- OBJETIVOS

GERAIS

Analisar, por meio de técnicas morfológicas e imunohistoquímicas, a distribuição, a localização e os efeitos da crotoxina submetida a radiação ionizante, comparando estes achados com os encontrados com a forma nativa da crotoxina, em órgãos e células de camundongos CBA/J.

ESPECÍFICOS

Avaliar, de forma comparativa, utilizando técnicas imunohistoquímicas, a localização da crotoxina, nas formas nativa e irradiada, sobre junção neuromuscular de musculatura estriada esquelética de camundongos CBA/J, inoculados com dose supra-letal.

Investigar as possíveis alterações morfológicas estruturais e ultra-estruturais de músculos esqueléticos de animais inoculados com as formas da toxina.

Analisar os órgãos de clareamento da crotoxina, visando a sua localização e quantificação, com pesquisa de eventuais alterações morfológicas.

Avaliar e quantificar a captação e internalização de crotoxina, por macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J, em cultivo isolado.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1-Materiais

1.1- Reagentes Gerais

Todos os sais e demais reagentes usados foram de qualidade pró-análise, sendo a água utilizada purificada em sistema Milli Q, apresentando resistividade maior que 18 mega Ω . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto.

1.2- Veneno

Veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido junto ao Instituto Butantan, sendo mantido na forma dessecada e estocado a -20°C até o momento do uso.

1.3- Crotoxina

A crotoxina foi purificada a partir do veneno total de *C.d.terrificus*, segundo Nakazone e cols.(1984)⁸⁸ e Rogero(1978)¹¹¹, onde se utilizou cromatografia de exclusão molecular num sistema não desnaturante com posterior precipitação no ponto isoelétrico (pI crotoxina: 4,7)⁸⁹. Esta purificação foi feita na Supervisão de Radiobiologia do IPEN, pelo Grupo de Venenos.

1.4 - Fixador para órgãos e células, ao nível de microscopia óptica

Quatro gramas de paraformaldeído P.A. foram dissolvidos em 50 ml de tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7.2. Submeteu-se a mistura ao aquecimento a 80°C e NaOH 1N foi sendo acrescentado, gota-a-gota, para facilitar a dissolução do paraformaldeído. Resfriou-se em água corrente e o volume foi completado para 100 ml com o mesmo diluente. Conferiu-se o pH (7.2) e conservou-se a 4°C pelo tempo máximo de 2 dias.

1.5 - Fixador para órgãos ao nível de microscopia eletrônica

Foram utilizados dois sistemas de fixação dependendo do destino dos preparados. Em preparados para inclusão em Araldite, foi utilizado aldeído

glutárico, com pureza específica para microscopia eletrônica (E.M. Grade) a 2% em PBS (salina tamponada com fosfato - NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,00M pH 7.2). O produto foi preparado na hora do uso e conservado a 4°C. Em preparados para inclusão em resina LR-White Hard Grade[®], para imunohistoquímica ao nível ultra-estrutural, utilizou-se uma solução fixadora contendo paraformaldeído 4%, aldeído glutárico 1% em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7.2, preparada sempre no momento da fixação.

1.6 - Animais Experimentais

Camundongos isogênicos CBA/J, machos, pesando entre 25 e 35g, procedentes do Biotério do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (FMUSP) foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada e receberam ração comercial e água *ad libitum*.

2- Métodos

2.1- Irradiação de veneno total de *C.d.terrificus* e de crotoxina purificada

As amostras foram irradiadas segundo Nascimento(1991)⁸⁹. Brevemente, as frações para irradiação dissolvidas numa concentração de 2mg/ml em NaCl 0.15M e centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos a 4°C, foram submetidas a ação da radiação gama de forma homogênea, em presença de oxigênio à temperatura ambiente numa taxa de dose de 540Gy/h e dose total de 2000Gy, utilizando-se, para tal, uma fonte de ⁶⁰CO (GAMMACELL 220 - Atomic Energy of Canada Ltd). Após a irradiação, as amostras foram aliquotadas e mantidas a -20°C até o momento do uso. O processo foi desenvolvido na Supervisão de Radiobiologia do IPEN, pelo Grupo de Venenos.

2.2 - Determinação de toxicidade da Crotoxina Nativa

Para efeito de dose comparativa, optou-se pela determinação da DL₅₀ da crotoxina nativa com subsequente utilização da quantidade relativa em microgramas por cada 20g de peso dos animais. Todas as demais amostras de veneno ou toxina, nativas ou irradiadas foram inoculadas numa concentração relativa a 5DL₅₀ da crotoxina nativa.

A dose letal 50%(DL₅₀) foi determinada em camundongos albinos de aproximadamente 18 a 22g, em base logarítmica e utilizando o teste de Spearman-Kärber na determinação da dose letal e seu intervalo de confiança, conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde.¹⁴⁰

2.3- Conjugados e Reagentes específicos utilizados

2.3.1- Produção de anti-crotoxina conjugado a peroxidase

Para utilização em ensaio de detecção de crotoxina nativa pelo método de imunoperoxidase direta²⁶, foi sintetizado um conjugado anti veneno total de *C.d.terrificus/C.d collilineatus* diretamente ligado a peroxidase⁵⁹.

Brevemente, soro anticrotálico (SAC) (Instituto Butantan), produzido com os venenos das serpentes acima descritas, e previamente dializado contra tampão borato 0.1M pH 7.4, foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Proteína A-Sepharose CL 4B, objetivando a obtenção de IgG totais. O SAC foi diluído em igual volume de PBS e aplicado à coluna, procedendo-se a filtração deste num fluxo de aproximadamente 30 ml/h. Após isso, lavou-se a coluna com PBS, até não mais serem detectados resíduos de proteína, através do método de Bradford²⁰. O material ligado a coluna foi eluído pela adição de tampão Glicina pH 2.8 e imediatamente neutralizado com Tris 1,5M pH 8,8. Estas frações foram exaustivamente dializadas contra PBS. Posteriormente, as IgG purificadas foram conjugadas a peroxidase segundo Harlow e Lane (1988)⁵⁹, como descrito a seguir.

Quatro miligramas de peroxidase tipo VI ("horseradish peroxidase" -SIGMA) dissolvidos em 1 ml de água bidestilada foram adicionados de uma solução de periodato de sódio 0.1M preparado na hora e mantidos sob agitação leve por 20 minutos à temperatura ambiente. Após isso, a mistura sofreu diálise contra tampão acetato de sódio 0.001M pH 4.4 por 18 horas a 4°C. Adicionou-se 20 µl de tampão carbonato de sódio 0.1M pH 9.5, com adição imediata de 1 ml da fração de IgG purificada, sofrendo agitação ocasional por 15 minutos. A adição de 100µl de solução de boro-hidreto de sódio (4mg/ml em água destilada) precedeu a incubação da mistura por 2 horas a 4°C. Ao final, o produto foi exaustivamente dializado contra tampão borato de sódio 0.1M pH 7.4, adicionado de glicerol a 60% em tampão borato pH 7.4 em igual volume e estocado a 4°C.

2.3.2 - Biotinilação de IgG de coelho anti-crotoxina nativa (CJ1)

Visando sua utilização como anticorpo primário em imunohistoquímica ao nível de microscopia óptica, procedemos a biotinilação de antisoro induzido em coelhos por crotoxina nativa.

Soro de coelho anti-crotoxina nativa, gentilmente cedido por R.A. de Paula / IPEN/CNEN/SP, foi processado para obtenção de IgG purificadas em coluna de proteína A Sepharose CL 4B, como descrito anteriormente. As IgG assim obtidas foram submetidas a biotinilação segundo técnica de Harlow e Lane (1988)⁵⁹. Brevemente, uma solução de IgG numa concentração de 2mg/ml em tampão borato pH 8.8 0,1M foi adicionada de uma solução de éster de biotina numa proporção de 50 μ g desta para cada mg de IgG. Após agitação por 4 horas a temperatura ambiente, adicionou-se 250 μ l de NH₄Cl 1M para cada 250 μ g de éster de biotina utilizado, mantendo-se em incubação por 10 minutos. Procedeu-se, então, a uma diálise exaustiva contra tampão borato pH 7.4. Ao final, o dializado foi alíquotado e estocado a -20°C.

2.3.3 - IgG de Cabra anti-IgG de coelho conjugada com ouro coloidal com 10nm de diâmetro(Sigma)(CJ-2)

Utilizado como anticorpo secundário nas reações imuno-histoquímicas em nível ultra-estrutural.

2.3.4 - Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (Sigma)⁶⁸

Utilizado com o objetivo de ampliar a sensibilidade de detecção do anticorpo biotinilado, baseado no fato de que a avidina possui 4 sítios de ligação para conjugados com biotina⁶⁷.

2.3.5 - Cromógeno utilizado para revelação de peroxidase em reações imunohistoquímicas em microscopia óptica (DAB-H₂O₂)

Trinta miligramas de DAB (3,3' diaminobenzidina) foram dissolvidos em 50 ml de PBS pH 7.2, filtrados em papel de filtro e o volume foi completado para 100 ml com o mesmo diluente, após acréscimo de 200 μ l de peróxido de hidrogênio a 3%. Esta solução foi sempre preparada na hora do uso.

2.4- Caracterização das Amostras de Veneno e Toxina, e Anticorpos

2.4.1- Determinação de concentração Protéica

Amostras de veneno total nativo ou irradiado e crotoxina nas mesmas formas foram submetidas ao método de Bradford²⁰, que detecta a concentração protéica através da interação das proteínas com um corante (Coomassie Brilliant Blue G-250 - CBB G-250) em meio ácido, sendo a intensidade da cor desenvolvida diretamente proporcional a concentração de proteína na amostra, utilizando-se padrões de gamaglobulina humana.

Brevemente, em cubetas de plástico, 3 ml de Reagente de Bradford (CBB G-250-100mg/Etanol absoluto-50ml/Ác.fosfórico 85%-100ml/Água dest. q.s.p. 1000ml) foram adicionados de 100 μ l da amostra dissolvida em PBS pH 7.2. Após 5 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A reação foi linear entre 10 e 100 μ g de proteína utilizada.

2.4.2- Titulação do anticorpo primário (CJ1) (Microscopia óptica)

O anticorpo de coelho foi submetido ao ensaio de ELISA¹²⁸ para a determinação de seu título e padronização da concentração ótima a ser utilizada nos ensaios posteriores.

Brevemente, a crotoxina nativa ou irradiada previamente diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1 μ g ctx/200 μ l/poço) foi utilizada para sensibilizar placas de 96 poços (Hemobag). Após incubação por 2 horas a 4°C e posterior lavagem com PBS Tween 20 0.05% pH 7,2 (PBST), os poços foram bloqueados por 2 horas em câmara úmida a 4°C, pela adição de uma solução de leite desnatado (Molico) a 5% em PBST. Após isso, procedeu-se a lavagem da placa com PBST acrescido de leite a 2%. O anticorpo foi diluído previamente em PBS contendo leite a 2% (1/10, 1/100, 1/1000, 1/5000) e adicionado nos respectivos poços num volume de 200 μ l/poço, onde permaneceu por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Lavagens sucessivas com PBST precederam a adição da substância cromogênica (OPD-0.008g/tampão fosfato-citrato pH 5.0-24ml/H₂O₂ 30%-12 μ l) num volume de 200 μ l/poço que completou a reação após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi paralizada pela adição de 20 μ l/poço de H₂SO₄ 4N e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de microplacas (MultiScan) com filtro de 492 nm.

2.4.3- Titulação do Anticorpo secundário (CJ2) para imuno-eletrônica.

Utilizou-se padronização prévia em ensaios envolvendo tecidos de camundongos oriundos dos mesmos experimentos dos quais o título ideal para ensaio foi obtido.

2.4.4- Grau de pureza e reatividade de Amostras e Conjugados

2.4.4.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (EGPA-SDS)

Para determinar o grau de pureza das toxinas utilizadas, eventuais alterações ocorridas nas amostras após irradiação ou possíveis impurezas, utilizamos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, segundo Laemli (1970)⁷⁷.

Foi feita EGPA-SDS num sistema descontínuo e desnaturante, usando gel de empilhamento composto por Acrilamida-Metileno Bisacrilamida (30/0,8) 5% em tampão Tris-HCl 0.125M pH 6,8, SDS 0,1% e gel de resolução contendo Acrilamida/Bisacrilamida 15,0%, tampão Tris/HCl 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%. O gel foi polimerizado quimicamente pela adição de TEMED e persulfato de amônio.

As amostras, nativa e irradiada, bem como padrão de peso molecular (tabela I) e controles, na concentração de 2mg/ml em PBS pH 7,2, foram desnaturadas e reduzidas, após dissolução destas em tampão de amostra (Tris-HCl 0.0625M; SDS 2%; Glicerol 10%; β -Mercaptoetanol 5%; Uréia 1M; Azul de bromofenol 0.001% 50%-v/v), e aquecimento em banho-maria a 100°C por 3 minutos.

Foram aplicadas 10 μ g de cada amostra por poço e a corrida eletroforética ocorreu na presença de Tris 0.025M-Glicina 0.192M pH 8,3, a 90-110 V (20-30 mA) por cerca de 2 horas.

Após a corrida, os géis foram corados com CBB G-250/metanol 50%/ácido acético 7% por 4 horas à temperatura ambiente, e descorados com uma solução de metanol 45%/ácido acético 10%.

A estocagem dos géis se processou após a colocação dos mesmos em solução de metanol 40%/glicerol 1% por 6 horas e secagem em estufa a 42°C por 12 horas, entre folhas de papel celofane comercial.

Tabela I- Padrão de proteínas como referência para EGPA-SDS

Proteínas	Peso Molecular (Daltons)
Albumina Bovina	66.000
Ovalbumina	45.000
3-fosfato desidrogenase	36.000
Tripsinogênio	24.000
Inibidor de tripsina de soja	20.100
Anidrase carbônica	20.000
α -lactalbumina	14.200

2.4.4.2- Western Blotting¹²⁹

Neste ensaio teve-se como objetivo determinar a antigenicidade de amostras de veneno total e de crotoxina frente ao conjugado utilizado (CJ1), bem como verificar a reatividade e especificidade do mesmo frente as referidas amostras.

Brevemente, as amostras, todas numa concentração de 10 μ g, foram submetidas a EGPA-SDS em gel 15.0% segundo metodologia anteriormente descrita. Após isso, o gel foi colocado em tampão de transferência (Tris 50 mM-Glicina 380 mM-SDS 0.1%-Metanol 20%) a 4°C por 10 minutos. Procedeu-se a montagem do gel com membrana de nitrocelulose, ladeados por folhas de papel de filtro. Esse conjunto foi colocado em cuba de acrílico vertical, preenchida com tampão de transferência e a eletroforese foi conduzida a uma voltagem constante de 40 V (150-180 mA) a 4°C por 18 horas. Após isso, o gel foi corado como descrito para EGPA-SDS para verificar a eficiência da transferência. A membrana de nitrocelulose foi, então, bloqueada com tampão bloqueador (Tris-HCl 50 mM-NaCl 10 mM-BSA 2% pH 7.4) por 18 horas sob agitação a 4°C.

Lavagens repetidas da membrana com PBST precederam a incubação da mesma com CJ1 1/1000 (como determinado por ELISA), que terminou após 60 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Nova lavagem foi feita e a revelação se deu pela adição de uma solução de DAB-Co-H₂O₂ (DAB-30mg/CoCl₂ 0.3%-1 ml-PBS pH 7.2-q.s.p. 100 ml). A reação foi interrompida por lavagens repetidas da membrana com água destilada.

2.5- Modelos Experimentais

2.5.1- Modelo de envenenamento agudo *in vivo*

2.5.1.1- Análise estrutural

Foram utilizados camundongos CBA/J, machos, pesando entre 25 e 30g. Os animais foram divididos em 4 grupos de 12 animais cada e estes, por sua vez, divididos em 4 sub-grupos (n=3), a saber, 0, 15, 30 e 60 minutos. Os grupos foram inoculados com 5DL₅₀ de crotoxina nativa(CTN) e quantidades equivalentes em peso das demais toxinas, a saber. crotoxina irradiada com 2000 Gy (CTI), veneno total não irradiado(VTN), veneno total irradiado com 2000 Gy (VTI), sempre pelo plexo retro-orbital num volume de 0.1 ml em salina fosfatada estéril (PBSE) por animal. Os animais controle receberam PBSE pela mesma via. Após decorridos os respectivos tempos os animais, levemente anestesiados com éter, foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados, sendo coletados o coração, pulmão, cérebro, fígado, baço, rim e músculo tibial anterior e músculo diafragma. Os órgãos foram imediatamente imersos no fixador específico, à frio (4°C).

2.5.1.2- Análise ultra-estrutural (Microscopia eletrônica)

De grupos de animais injetados de forma semelhante ao acima descrito foram coletados fragmentos de músculo tibial anterior e músculo diafragma que foram imediatamente imersos em fixador para microscopia eletrônica por 2 horas, seguida de contrastação com tetróxido de ósmio a 1%, por igual período. Os espécimes sofreram desidratação gradual através de passagem em bateria alcoólica crescente (etanol 50%, 70%, 80%, 95% e absoluto) e posterior impregnação com resina epoxi Araldite. Esta se completou após 4 dias de curagem a 65°C. Após escultura para isolamento do material, cortes semi-finos exploratórios precederam cortes ultra-finos, que foram montados em telas de cobre de malha 200.

2.5.1.3- Histologia e Imunohistoquímica

A- Microscopia Óptica

Utilizamos para estes ensaios, uma adaptação da técnica de Hsu *et al*, (1981)⁶⁷.

Brevemente, órgãos obtidos dos animais experimentais, após fixação cuidadosa, com pelo menos 2 trocas de fixador e 6 horas de incubação a 4°C, foram submetidos a processamento histológico usual para inclusão em parafina, sendo feitos cortes de 7µm montados em lâminas de microscopia, previamente revestidas com cola lavável. Parte dos cortes sofreram coloração histológica usual (Hematoxilina-Eosina -H.E.) para controle de qualidade.

Cortes representativos foram submetidos a desparafinização pelo tratamento com Xilol (Xilol I- 45 minutos à 56°C; Xilol II, III- 3 minutos, à temperatura ambiente) com posterior hidratação em série alcoólica decrescente até água bidestilada, e equilíbrio do pH em PBS pH 7.2 por 5 minutos. A seguir, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação do material numa mistura de metanol/peróxido de hidrogênio 3% (1:1) por 45 minutos. Após lavagem com PBS, a incubação das lâminas foi feita com CJ1 1:1000 por 60 minutos, à temperatura ambiente em câmara úmida. Após duas novas lavagens de 10 minutos cada com PBS, as preparações foram incubadas com ABC 1:1000, à temperatura ambiente em câmara úmida, por 60 minutos. Nova lavagem foi efetuada e a revelação foi feita pela adição de uma solução de DAB-H₂O₂ por 5 minutos. Assim, após enxaguar as preparações em tampão, estas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, com posterior desidratação em série alcoólica crescente e diafanização em xilol. Ao término, as lâminas foram montadas utilizando-se resina artificial (HARLECO-Hartman Leddin, Co-PA). A análise das preparações foi feita em microscópio ZEISS-Axiophot com lentes plano-apocromáticas e os campos significativos foram fotografados.

B- Imuno-eletrônica

Os espécimes coletados foram submetidos a desidratação gradual através da passagem em bateria alcoólica crescente (etanol 50%, 70%, 80%, 95% e absoluto) e posterior impregnação com resina acrílica LR-White Hard Grade[®] :etanol absoluto (1:1). A seguir, os espécimes foram incluídos na resina em cápsulas de gelatina em ambiente saturado de nitrogênio líquido com o intuito de

acelerar a polimerização. As cápsulas contendo o material foram estocadas em ambiente seco, após o dessecação á vácuo em presença de substância higroscópica.

Para imuno-eletrônica, baseamo-nos em adaptação do método de Polak & Van Noorden (1984)⁹⁷. Telas de níquel contendo material, previamente incubadas com TBS/BSA 1%/NaN₃ 0.05% pH 7.2 por 5 minutos, foram bloqueadas com soro normal de cabra 1/30 por 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se, então, a incubação com CJ1 1/400 por 16 horas a 4°C. Após lavagem com TBS/BSA 0.2%/NaN₃ 0.05%/Tween 20 0.1% pH 7.2, 4x5 minutos, incubou-se o material numa solução de TBS/BSA 1%/NaN₃ 0.05% pH 8.2 por 30 minutos. Adicionou-se, então, o anticorpo secundário (CJ2), 1/20 em tampão TBS/BSA 1%/NaN₃ 0.05% pH 8.2 por 60 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com TBS/BSA 0.2%/NaN₃ 0.05%/Tween 20 0.1% pH 7.2, 4x5 minutos, o material foi fixado em 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0.1M pH 7.4 por 10 minutos, sofrendo posterior lavagem com água destilada e contrastação em acetato de uranila, no escuro, 15 minutos, e citrato de chumbo, 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a observação em microscópio eletrônico ZEISS EM 109 e os campos significativos foram micrografados.

2.5.2- Modelo *in vitro*

2.5.2.1- Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos CBA/J não estimulados, machos, pesando entre 25 e 35g foram utilizados neste estudo com o objetivo de se obter macrófagos residentes no peritônio. Os animais foram sacrificados por exposição prolongada ao éter e injetados, intraperitonealmente, com 3 ml de PBS pH 7.2, contendo gentamicina (45µg/100ml), evitando-se puncionar as alças intestinais. A seguir, procedeu-se ao massageamento do abdomen gentilmente, por alguns segundos, aspirando-se o líquido peritoneal, que foi imediatamente transferido para um tubo plástico em banho de gelo. As amostras individuais foram misturadas e submetidas a centrifugação a 800-1000 giros/minuto em tubos de 10ml por 15 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado em igual volume com PBS-gentamicina, procedendo-se a contagem diferencial em câmara de Neubauer e posterior diluição numa concentração final de 2×10^6 células/ml. A seguir, procedeu-se a fase de aderência dos macrófagos a lamínulas de vidro circulares (GlassTécnica Ltda-Brasil), estando estes numa concentração de 2×10^5 / lamínula em meio RPMI 1640 completo (RPMI 1640 com 10% de soro fetal

bovino inativado (SFB)). As lamínulas, então, permaneceram, em estufa a 37°C por 20-30 minutos, após o qual foram lavadas com meio RPMI 1640 incompleto, e um novo meio completo foi adicionado. As células foram mantidas em estufa de CO₂ saturado a 5.0% a 37°C (Forma Scientific) por 24 horas, após o qual foram selecionadas as lamínulas para o ensaio, levando-se em consideração a concentração e a viabilidade dos macrófagos aderidos.

2.5.2.2- Ensaio imunohistoquímico

Lamínulas em duplicata, previamente selecionadas, foram distribuídas em placa de poli-estireno de 24 poços para cultura de células (Corning Lab.Sci.Co.-UK) (1 lamínula/poço).

A crotoxina e o veneno total foram diluídos em meio RPMI 1640 incompleto, numa concentração de 10 μ g/100 μ l/lamínula e incubados com macrófagos nos tempos de 15, 30 e 60 minutos. Foram feitos controles positivo (C1) e dois negativos, sendo um (C2), visando evidenciar o bloqueio da peroxidase endógena e outro (C3) a biotina endógena. Esses controles foram ensaiados até o tempo máximo de experimento (60 minutos).

Após o término de cada tempo, as lamínulas foram enxaguadas em PBS pH 7.2 e imediatamente fixadas em paraformaldeído a 4% tamponado em tampão fosfato de Sorensen pH 7.2 por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isso, foram novamente enxaguadas no mesmo tampão anterior e procedeu-se a deslipidificação das células pela adição de solução de metanol/acetona (1:1) por 30 segundos, objetivando otimizar a internalização dos anticorpos. Novamente enxaguadas em PBS, as preparações foram imersas em H₂O₂ a 1% por 3 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. Duas incubações de 5 minutos cada em PBS precederam a adição de CJ1 1:1000, sob agitação à temperatura ambiente, que se completou após 60 minutos. Após lavagem em PBS 3x 10 minutos, adicionou-se o complexo ABC 1:1000, onde o material permaneceu por 60 minutos. Nova lavagem em PBS foi feita e uma solução de DAB-H₂O₂ revelou a reação em 5 minutos. As preparações foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e diferenciadas em água amoniacal (água bidest.-100ml; amônia comercial- 50 μ l) por 20 segundos, desidratadas em metanol/acetona (1:1) por 1 minuto e montadas sobre lâminas de microscopia com resina sintética (Harleco-Hartman Leddon Co -PA).

IV- RESULTADOS

1- Caracterização das amostras de venenos, toxinas e anticorpos

1.1- Concentração Protéica

A dosagem de proteínas pelo método de Bradford das amostras nativas e irradiadas mostrou não ter havido redução na concentração protéica das amostras irradiadas, comparativamente com as formas nativas.

Optou-se por este método, uma vez que o método classicamente utilizado de dosagem protéica (Método de Lowry) parece superestimar o conteúdo protéico das amostras de venenos de serpentes, como foi observado por Nascimento (1991)⁸⁹.

1.2- Titulação do Anticorpo primário (CJ1)

Através do método de ELISA, obteve-se um título ótimo de 1/1000 para os testes imunohistoquímicos seguintes.

A sensibilização das placas foi feita, utilizando-se crotoxina nativa ou irradiada, e observou-se um maior reconhecimento da toxina irradiada por parte do conjugado, quando comparado com a forma nativa na mesma concentração (0.32 μ g/100 μ l).

1.3- Titulação do Anticorpo secundário (CJ2)

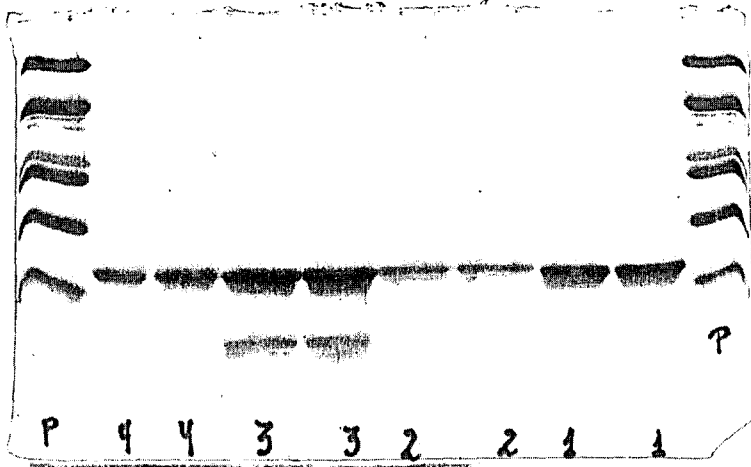
Foi adotada a concentração de 1/20 como a ideal, devido a observações em ensaios anteriores utilizando este conjugado em tecido murino nas mesmas condições de fixação e tratamento. Através de ensaios preliminares com tecidos de nossos experimentos, observamos o mesmo padrão de resposta, o que justificou a utilização desta concentração nos ensaios.

1.4- Grau de pureza e reatividade de amostras e conjugados (CJ)

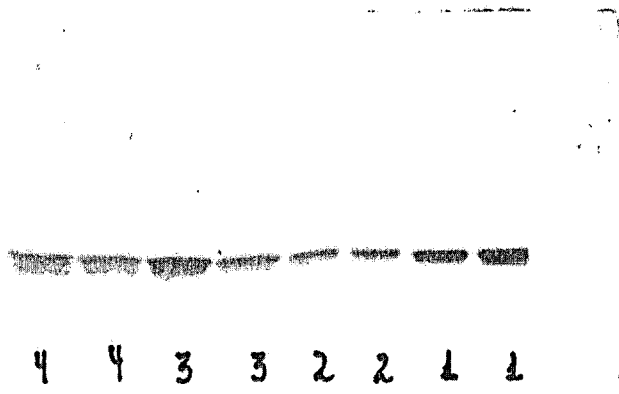
1.4.1- EGPA-SDS

A fig. 1a mostra o gel de resolução corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 contendo as amostras nativas e irradiadas.

Figura 1



A



B

Fig 01- Avaliação da pureza e reatividade de amostras nativas e irradiadas de veneno total de *C.d.terrificus* e crotoxina ;

a- Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA-SDS) 15% em sistema desnaturante, corado pelo Coomassie Brilliant Blue G-250. Observa-se a pureza das amostras de veneno total e de crotoxina, nativas ou irradiadas. A banda comum a todas as amostras, referente a crotoxina, se apresenta evidente com o mesmo padrão de migração eletroforética.

P- Padrão de proteínas para comparação de peso molecular (PM)

1- Crotoxina nativa purificada

2- Crotoxina irradiada a 2000Gy

3- Veneno total de *C.d.terrificus* nativo

4- Veneno total de *C.d.terrificus* irradiado a 2000Gy

Todas as amostras foram previamente tratadas com Uréia, β -Mercaptoetanol e SDS.

b- Transferência (Western blotting) das proteínas do gel apresentado em a em nitrocelulose (Conjugado: CJ1; revelador: DAB-H₂O₂-CO). Pode-se observar a especificidade do anticorpo primário (CJ1), uma vez que este reconhece, apenas, as bandas relativas a crotoxina nas amostras nativas ou irradiadas de veneno total e crotoxina purificada.

Todas demonstram a presença de bandas com o peso molecular compatível com as frações protéicas descritas na literatura. As frações de crotoxina purificada mostraram alto grau de pureza. Observa-se, nas amostras irradiadas, a presença de um borramento de bandas protéicas composto de proteínas de peso molecular elevado e variado, oriundas da ação da radiação sobre as amostras e de ocorrência comum, como observado por vários autores^{14,54,89,120}. Essas proteínas se apresentam na forma de agregados e a análise destes feita por Nascimento (1991)⁸⁹ demonstrou o seu caráter atóxico e imunogênico.

1.4.2- Western Blotting

A determinação da antigenicidade das amostras por Western Blotting evidenciou um ótimo reconhecimento das amostras por parte do conjugado, sendo a maior resposta frente as amostras irradiadas, comparativamente às nativas (Fig.1b). Observa-se, também, a alta especificidade do anticorpo frente as amostras ensaiadas, demonstrável pela reação praticamente isolada com a fração crotoxina.

2- Modelos Experimentais

2.1- Modelo de envenenamento agudo *in vivo*

2.1.1- Análise Estrutural (Microscopia Óptica)

2.1.1.1- Crotoxina Nativa ou Irradiada

A análise dos resultados obtidos com o modelo utilizando crotoxina nativa²⁶, demonstrou junções neuromusculares íntegras após 30 minutos de ensaio (Fig2a), sendo que, em limites mais tardios (60 minutos) e no primeiro tempo de ensaio (15 minutos), tais estruturas não foram evidenciadas com esse perfil. Entretanto, observamos estruturas grosseiras marcadas sugestivas de junções neuromusculares degradadas aos 60 minutos (Fig2b), o que nos levou a crer numa ação dependente do tempo da crotoxina sobre a estrutura juncional.

A maioria dos demais órgãos testados não mostrou marcação semelhante. No rim, observamos apenas discreta coloração em borda em escova dos túbulos renais, nos tempos de 30 e 60 minutos (Fig 2c e 2d).

Figura 2

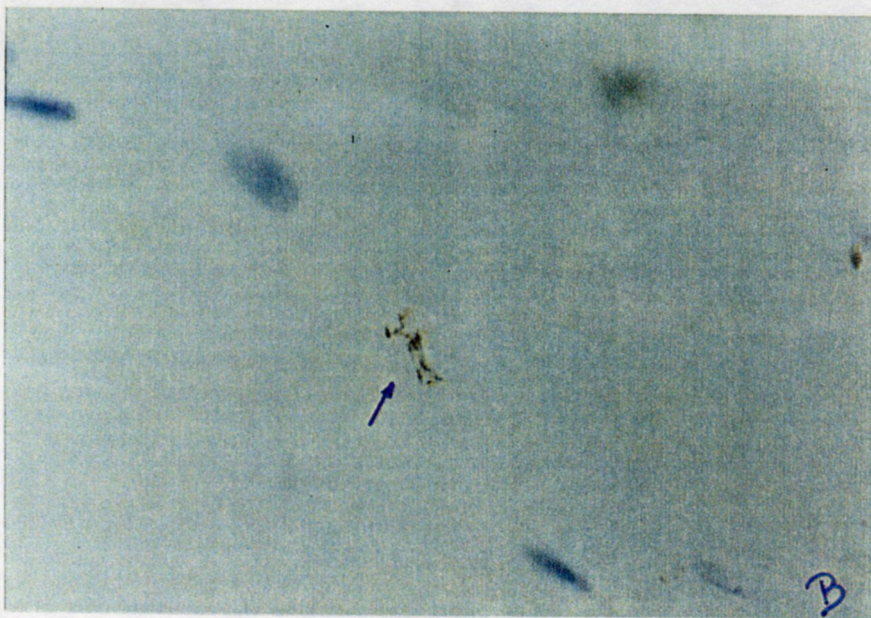
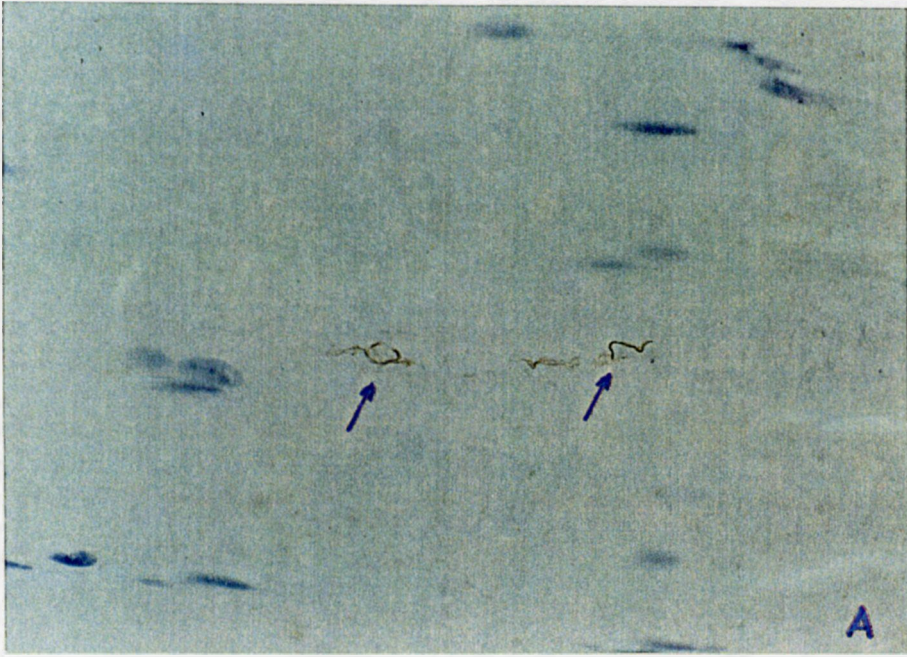
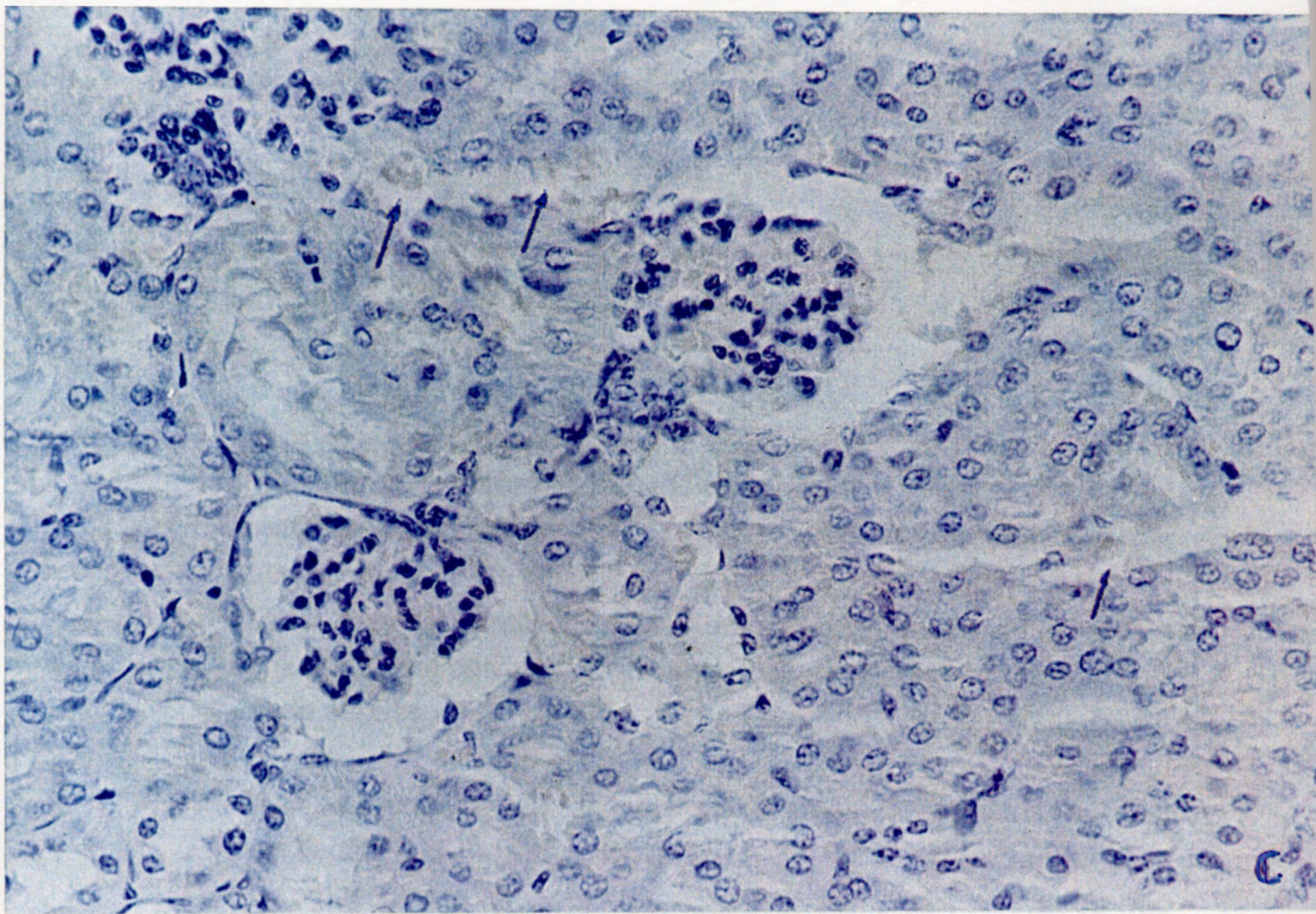


Figura 2



apresentam qualquer alteração morfológica. (200x)

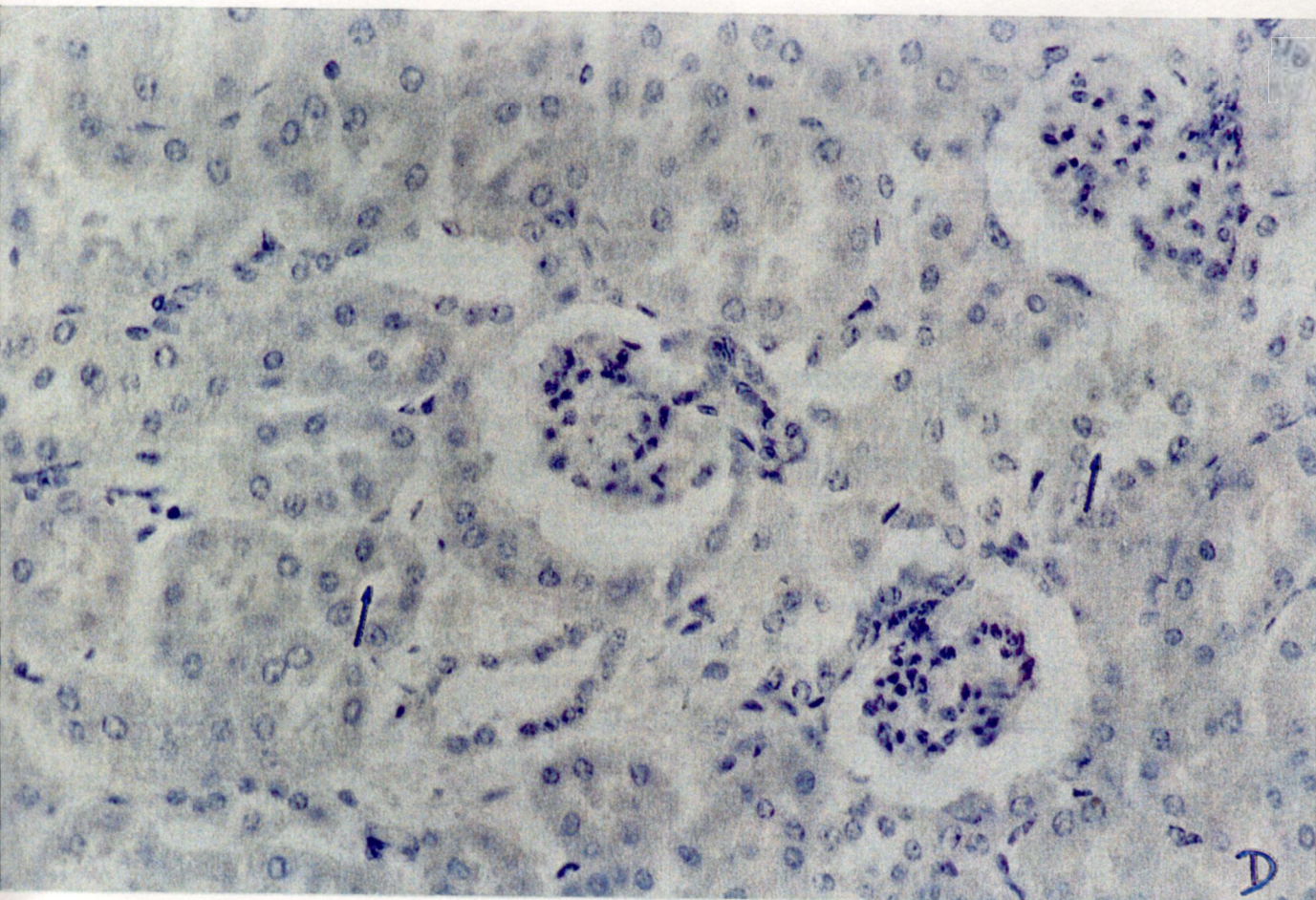


Fig. 02- Músculo estriado esquelético e rim de camundongos CBA/J inoculados com 5DL₅₀ de crotoxina nativa i.v., ensaiados com imunoglobulina de cavalo antiveneno de *C.d.terrificus* e *C.d.collilineatus* (Instituto Butantan) purificada por afinidade e conjugada com peroxidase (Imunoperoxidase direta) - Cortes com 7 μ m de espessura.

- a- M. tibial anterior de animais sacrificados 30 minutos após a inoculação da toxina. Observa-se a presença de junções neuromusculares íntegras marcadas (→); as fibras musculares não apresentam qualquer alteração morfológica. (63X).
- b- M. tibial anterior 60 minutos após a inoculação. Observa-se estrutura marcada, sem integridade preservada, sugerindo junção neuromuscular degradada. Entretanto, as fibras musculares se mantiveram normais, sem evidências de alterações produzidas pela toxina. (63X).
- c- Rim de animais inoculados 30 minutos após a inoculação de crotoxina nativa. Observam-se poucas marcações ao nível de borda em escova dos túbulos renais (→) , evidenciando o clareamento precoce da toxina. O parênquima renal se mostrou preservado (40X).
- d- Rim, aos 60 minutos, mostrando discretas marcações ao nível de borda em escova (→). Estrutura renal preservada (40X).

Nos animais inoculados com a forma irradiada da crotoxina, não fomos capazes de encontrar junções neuromusculares marcadas nas várias preparações ensaiadas, quer de músculo tibial ou diafragma, mesmo no tempo mais tardio do ensaio (60 minutos) (Fig3a). De uma forma geral, levando-se em consideração a morfologia dos espécimes, nenhuma alteração foi observada.

A maioria dos órgãos se apresentou negativa a marcação, com estrutura geral preservada. Entretanto, em nível hepático, discretas marcações foram observadas na periferia dos sinusóides de uma forma dispersa, mas focal, já aos 15 minutos de ensaio, não sendo, entretanto, tão evidente aos 60 minutos após o inóculo (Fig 3c). No rim, observou-se, também marcação em túbulo renal aos 15 minutos após o inóculo. Entretanto, ao contrário do que foi visto no fígado, esta persistiu até aos 60 minutos (Fig 3b). Quanto a morfologia, ambos os órgãos se mostraram preservados. Estes dados vem demonstrar o clareamento precoce da crotoxina irradiada, sem evidências morfológicas de danos sobre os órgãos analisados.

2.1.1.2- Veneno Total Nativo ou Irradiado

O mesmo padrão de marcação observado para ambas as formas da crotoxina, também foi observado em preparações envolvendo animais inoculados com veneno total nas duas formas. Observou-se, porém, uma marcação ao nível renal de forma constante (Fig.4b), semelhante a encontrada para a forma irradiada da crotoxina. Ao nível de musculatura estriada esquelética não se observou qualquer alteração que pudesse ser atribuída a uma ação do veneno (Fig.4a). Na mesma preparação, através da técnica por nós utilizada (ABC), não encontramos junções neuromusculares, seja íntegras ou degradadas.

2.1.2- Análise Ultraestrutural e de Imuno-eletrônica

Com relação a análise do material obtido de camundongos inoculados com crotoxina nativa (músculo tibial anterior) verificou-se que, após 30 minutos da inoculação da toxina, as estruturas musculares estavam preservadas, mostrando vasos íntegros, mitocôndrias sem dilatação e estrutura individual das miofibrilas preservadas, o mesmo sendo válido para

Figura 3

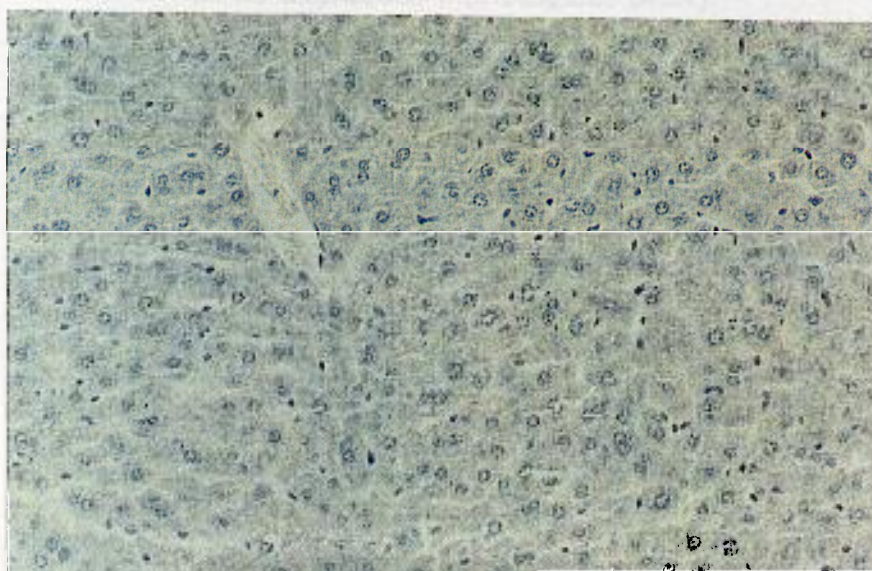
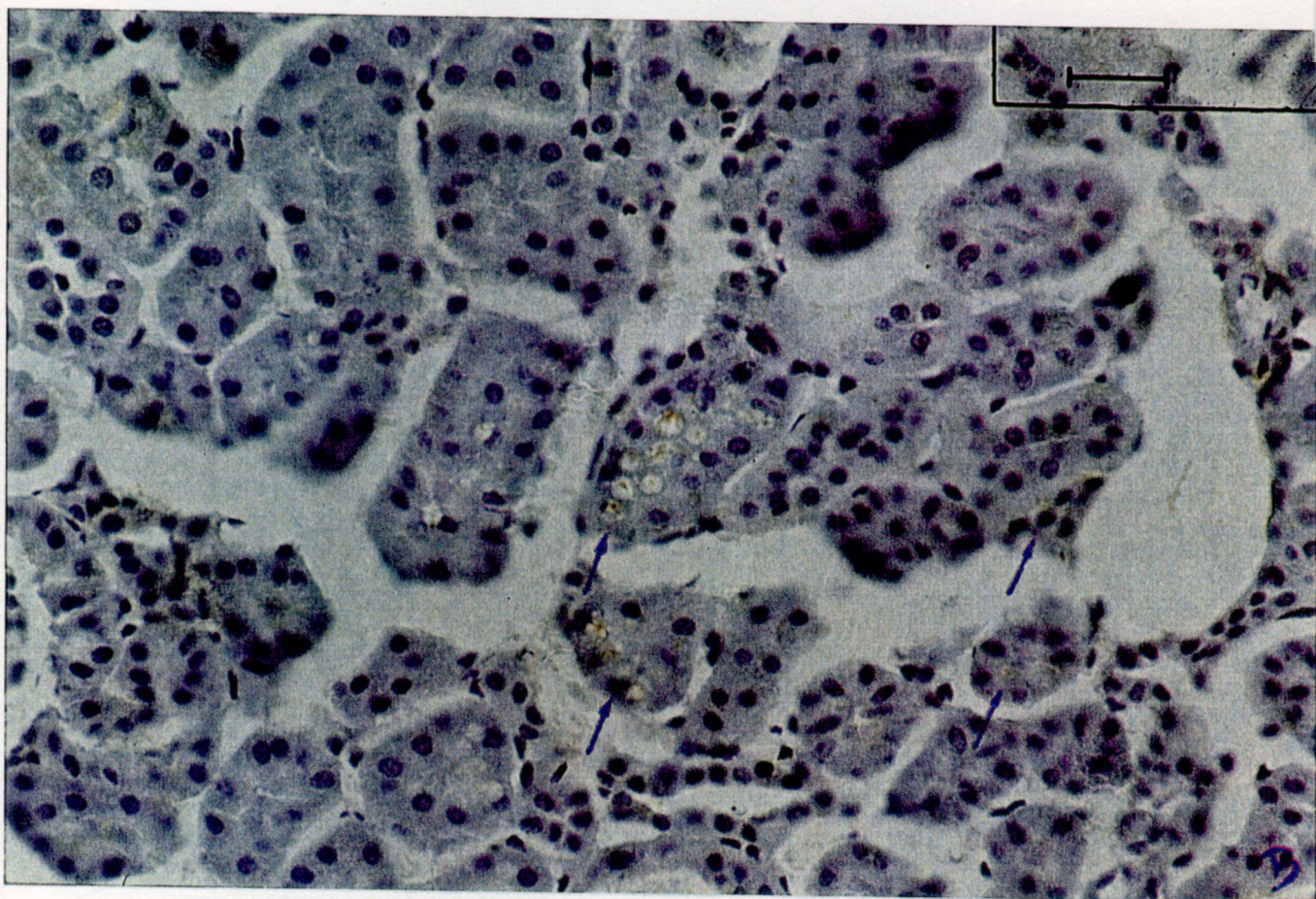
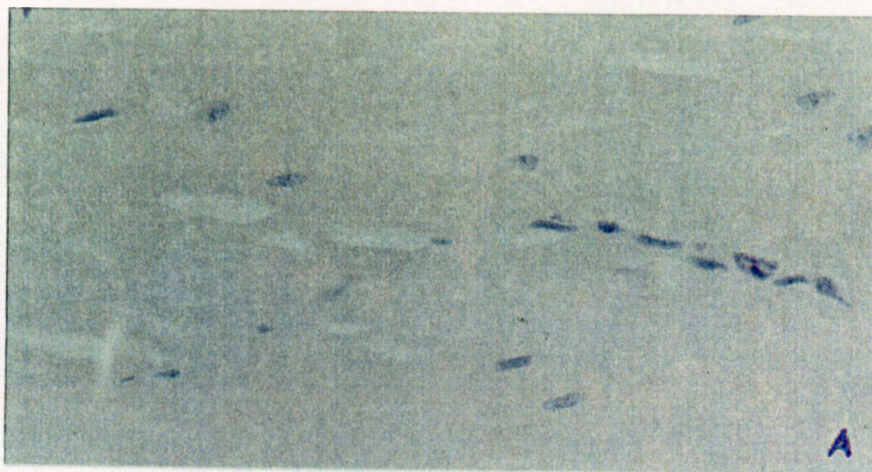


Fig. 03- Músculo estriado esquelético, rim e fígado de camundongos CBA/J inoculados com 5DL₅₀ de crotoxina irradiada i.v., ensaiados com CJ1 e revelados pelo sistema de imunoperoxidase indireta (ABC) - Cortes com 7 μ m de espessura.

- a- M. tibial anterior de animais sacrificados 60 minutos após a inoculação da toxina. Estrutura geral preservada (63X).
- b- Rim após 60 minutos da inoculação, apresentando marcações evidentes em borda em escova dos túbulos renais (→), sem evidências de alterações morfológicas (40X).
- c- Fígado aos 60 minutos após inóculo. Órgão preservado, sem marcações imunohistoquímicas para a crotoxina irradiada (40X).

Figura 4

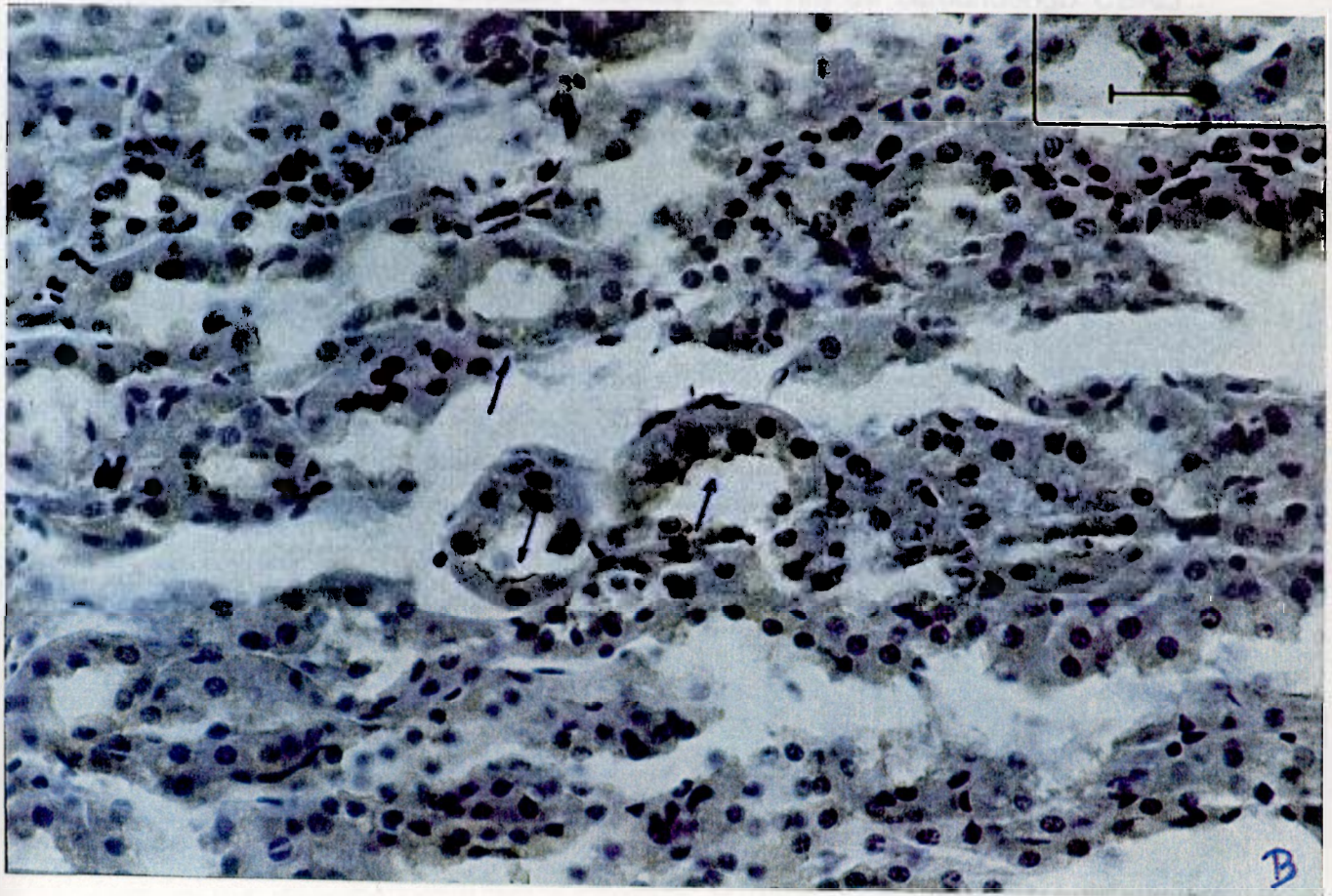


Fig. 04- Músculo estriado esquelético e rim de camundongo CBA/J inoculado com 5DL₅₀ de veneno total de *C.d.terrificus* irradiado i.v., ensaiados com CJ1 e revelados pelo sistema de imunoperoxidase indireta (ABC) - Cortes com 7 μ m de espessura.

- a- M. tibial anterior de animais sacrificados 30 minutos após a inoculação do veneno. Estrutura geral preservada, sendo semelhante aos animais controle (63X).

- b- Preparação de tecido renal de animais sacrificados 60 minutos após a inoculação do veneno. Observa-se marcação constante, já iniciada nos primeiros 15 minutos (dados não mostrados) em borda em escova dos túbulos renais (→). O tecido renal não apresentou alterações morfológicas devido a ação do veneno (63X).

Figura 5

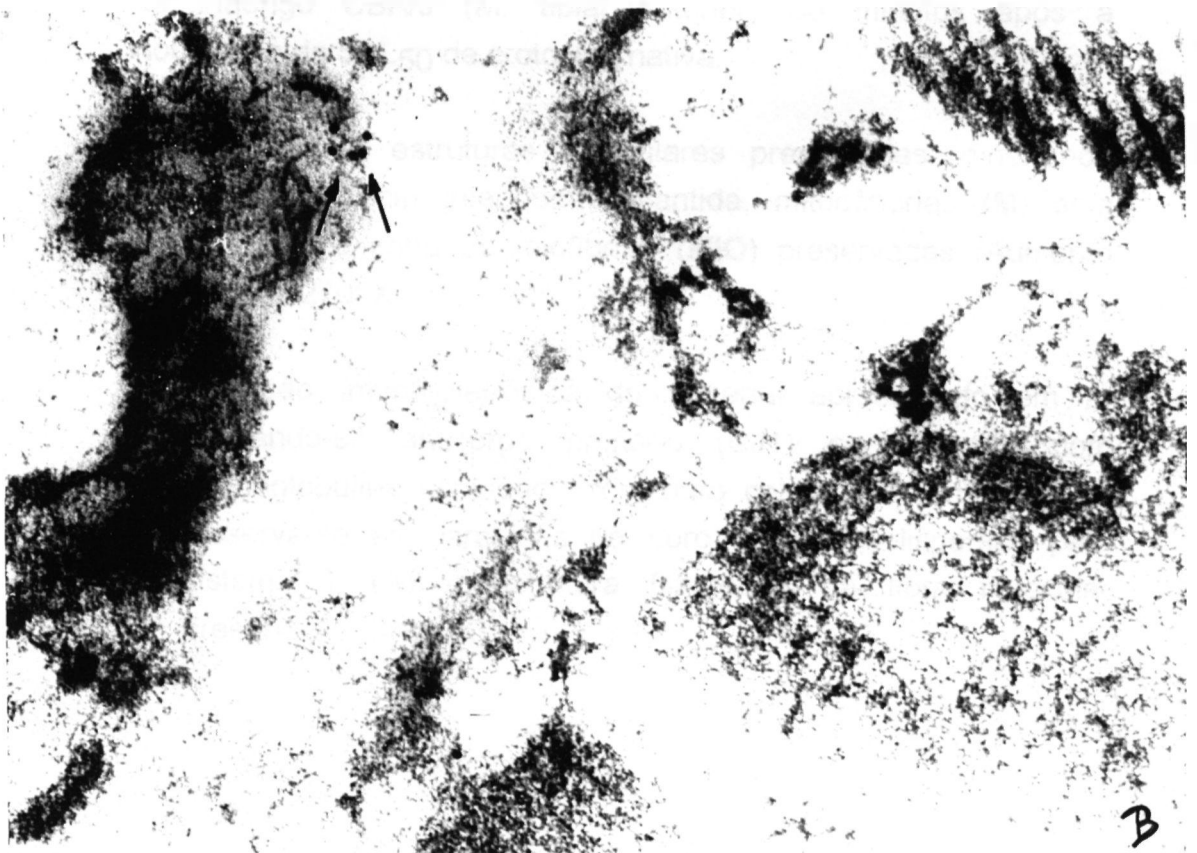


Fig. 05- Fotomicrografia de músculo estriado esquelético de camundongo CBA/J (M. tibial anterior) 30 minutos após a inoculação de 5DL₅₀ de crotoxina nativa.

a- Observa-se estruturas musculares preservadas, mostrando vasos (**V**) com integridade mantida, mitocôndrias (**M**) sem dilatação e estrutura miofibrilar (**MIO**) preservadas (Aumento original 2700X).

b- Reação imuno-eletrônica do material apresentado em **a**, utilizando-se anticorpo primário (CJ1) e revelação com imunoglobulina conjugada com ouro coloidal (10nm) (Sigma). Observa-se as partículas de ouro coloidal dispersas pelo sistema T (→) e estrutura filamentar da fibra muscular preservada (14800X).

as estruturas endoteliais (Fig 5a). Ao ensaio imunohistoquímico, tais preparações demonstraram a presença de crotoxina no sistema T (Fig.5b), sugerindo ser este um dos sistemas de condução utilizados na internalização da toxina. Entretanto, devido a escassez de junções neuromusculares nas preparações, não pudemos evidenciar marcações a esse nível.

Nas preparações de músculo de animais inoculados com crotoxina irradiada, não observamos quaisquer alterações morfológicas em vasos e miofibrilas, bem como em mitocôndrias, que se apresentaram preservadas. Quando do ensaio imunohistoquímico, não observamos junções neuromusculares, mas houve discreta positividade observada em sistema T da fibra muscular esquelética (Fig. 6).

Nos ensaios visando a análise ultra-estrutural, não utilizamos veneno total nativo ou irradiado.

2.2- Modelo *in vitro*

2.2.1- Aspecto geral dos macrófagos após ensaio

A morfologia e os caracteres tintoriais evidenciados pela contracoloração pareceram preservados nos dois primeiros tempos (Fig 7a e 7b) para a crotoxina nativa, sendo que, mais tardiamente (30 e 60 minutos), os macrófagos se apresentaram com poucos filopódios visíveis e as membranas citoplasmáticas estruturalmente irregulares, sugerindo relativa degeneração da célula pela menor adesão ao suporte (Fig 7c e 7d). Para a crotoxina irradiada, observou-se uma viabilidade mantida, levando-se em conta os parâmetros utilizados para a crotoxina nativa, mostrando que, mesmo após longa incubação em presença da toxina, as células ainda conservavam sua adesão e morfologia normais, comparável as células controle no mesmo tempo de incubação. (Fig 8a-c).

Quanto às células incubadas com veneno total nativo ou irradiado, os caracteres tintoriais também pareceram preservados, embora com menor viabilidade e maiores evidências de agressão celular. Não houve, entretanto, diferenças marcantes quanto a viabilidade dos macrófagos incubados com essas formas do veneno. Para ambas as formas, as células demonstraram viabilidade aparentemente reduzida, mesmo quando da análise no primeiro tempo de ensaio (15 minutos) (Fig 9a-c e Fig 10a-c).

Figura 6

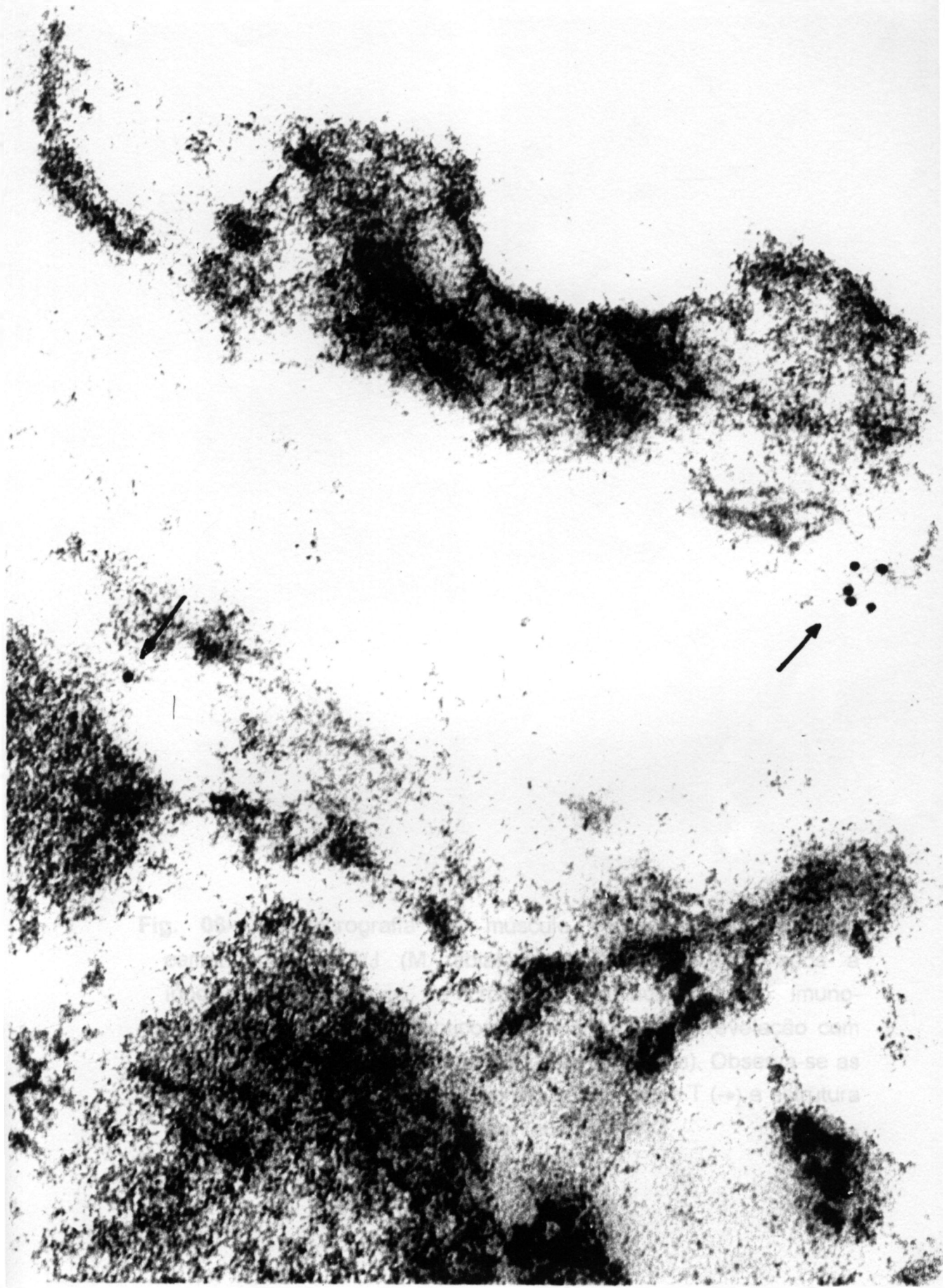
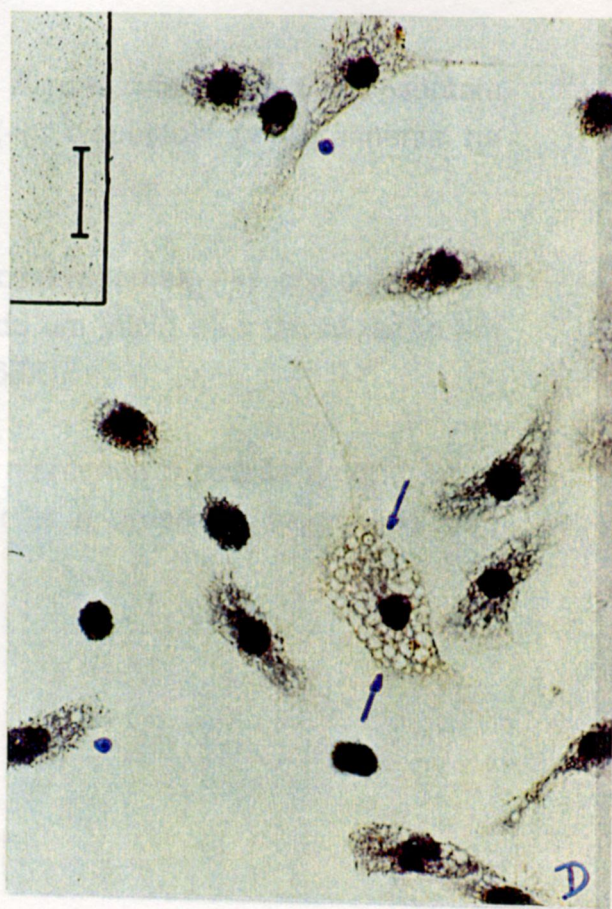
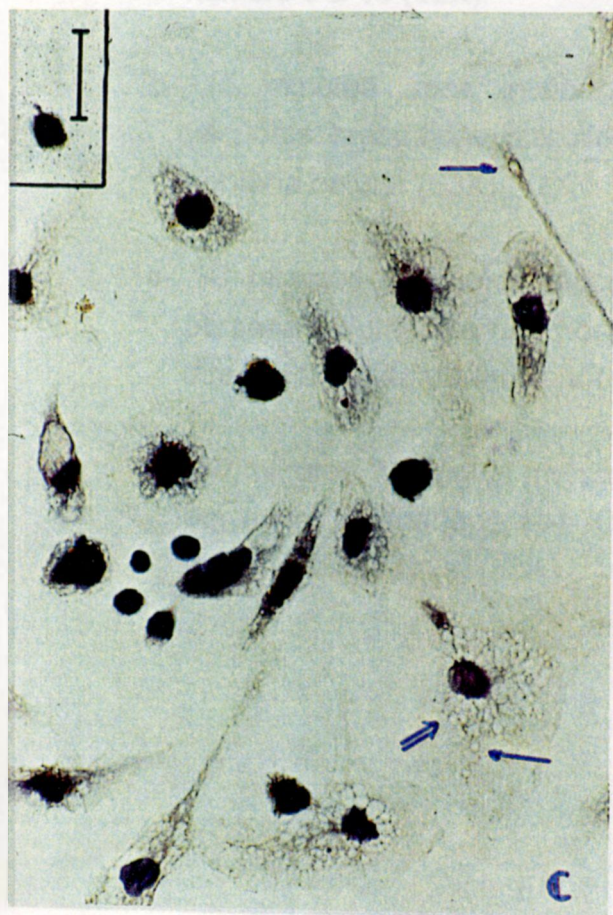
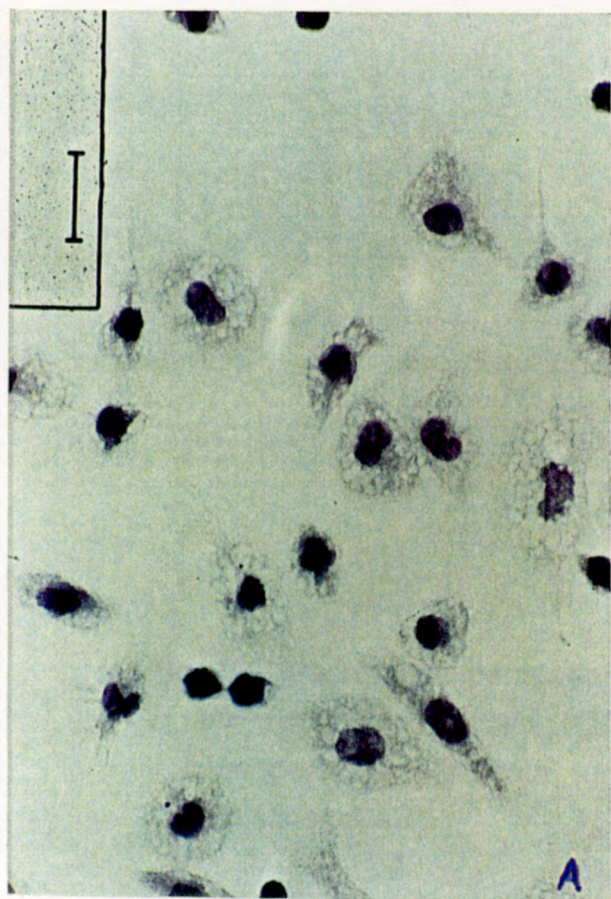


Fig. 6. (a) Crotoxina nativa (10000x). (b) Crotoxina irradiada (10000x).
Imunização com crotoxina nativa (10000x). Observar-se as
partículas de crotoxina (10000x).

Fig. 06- Fotomicrografia de músculo estriado esquelético de camundongo CBA/J (M. tibial anterior), 60 minutos após a inoculação de 5DL₅₀ de crotoxina irradiada. Reação imuno-eletrônica, utilizando-se anticorpo primário (CJ1) e revelação com imunoglobulina conjugada com ouro coloidal (10nm). Observa-se as partículas de ouro coloidal dispersas pelo sistema T (→) e estrutura filamentar da fibra muscular preservada (15000X).

Figura 7



A - Controle - Células íntegras e vacúolos são vacúolos lisossômicos marcados. Esse controle é válido, também, para as figuras de número 9 e 10 (50X)

Fig. 07- Macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J incubados com crotoxina nativa (10 $\mu\text{g}/500$ ml) e ensaiados por imunoperoxidase indireta, tendo CJ1 como conjugado e revelação pelo sistema ABC.

- a- Controle - Células íntegras e viáveis sem vacúolos fagocíticos marcados . Esse controle é válido, também, para as figuras de número 8 a 10 (63X).
- b- 15 minutos após incubação. Alguns macrófagos apresentam vacúolos fagocíticos marcados (\rightarrow), dispersos, principalmente na periferia celular (63X).
- c- 30 minutos. Vacúolos fagocíticos presentes (\rightarrow) dispersos pela periferia celular interna, mostrando um início de internalização em direção a região perinuclear (\Rightarrow) (63X).
- d- 60 minutos. Vacúolos marcados mantendo o padrão anterior, mas em maior quantidade (\rightarrow). Observar a presença de células com baixa viabilidade (\bullet) (63X).

Figura 8

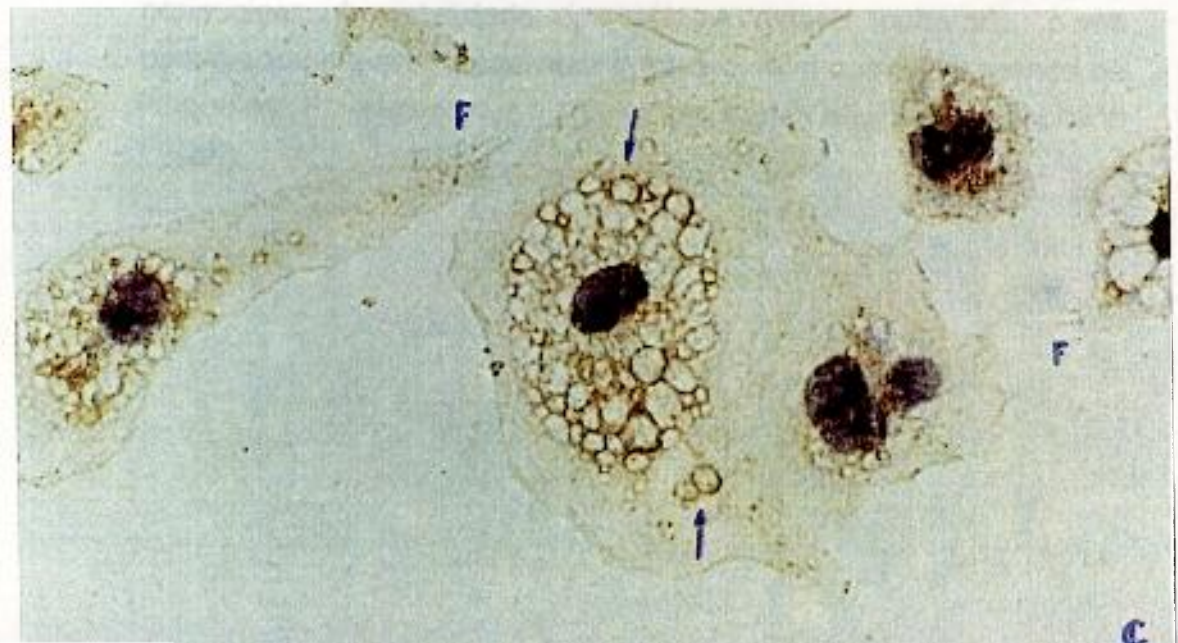
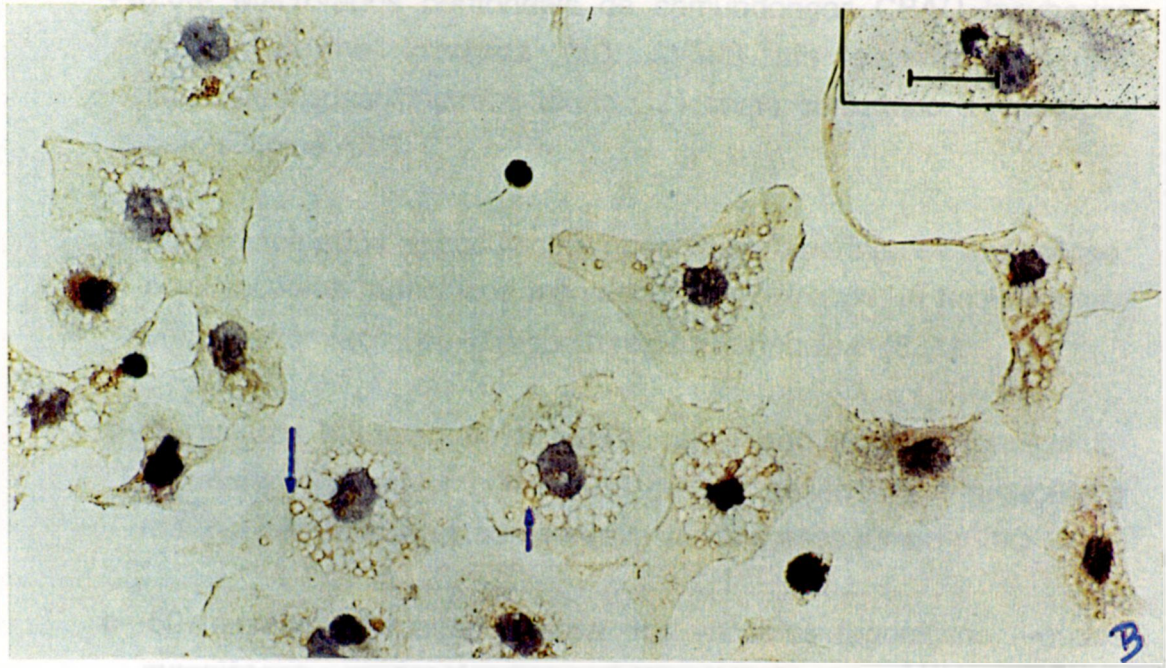
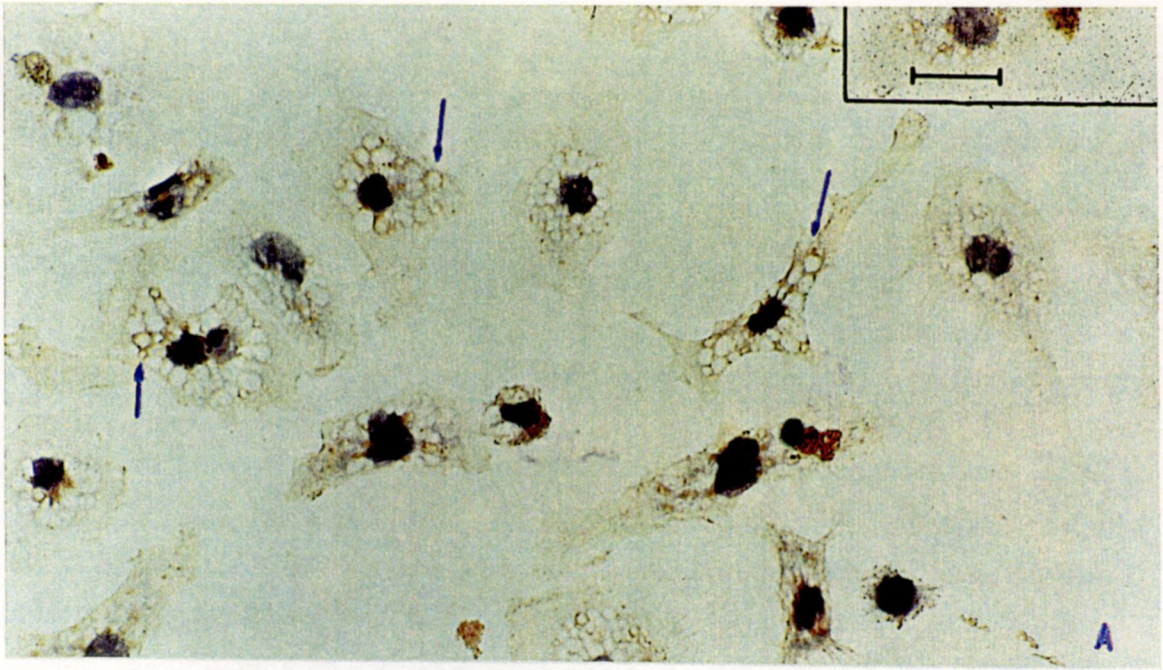


Fig.08- Macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J incubados com crotoxina irradiada (10 μ g/500 ml) e ensaiados por imunoperoxidase indireta, tendo CJ1 como conjugado e revelação pelo sistema ABC.

- a-** 15 minutos após a inoculação, observa-se uma intensa endocitose, com vacúolos fagocíticos marcados(→) mostrando, já neste tempo, uma interiorização em direção à região perinuclear (63X).

- b-** 30 minutos. Manutenção do padrão observado em **a**, demonstrando, entretanto, um maior número de células positivas à marcação; a maioria das células se apresentava viável a esse tempo (63X).

- c-** 60 minutos. Marcação intensa dos vacúolos fagocíticos (→) dos macrófagos, evidenciando-se internalização mantida na região perinuclear. A viabilidade das células esteve inalterada, como observado pelo arcabouço celular intacto, bem como a presença de filopódios (**F**), evidentes em células em franca atividade endocitária (100X).

2.2.2- Ensaio Imunohistoquímico

2.2.2.1-Crotoxina nativa ou Irradiada

De um modo geral, observou-se marcação dos vacúolos fagocíticos dos macrófagos já nos primeiros 15 minutos de ensaio, sendo esta reação menos intensa para a crotoxina nativa (Fig 7b) em comparação com a forma irradiada da toxina no mesmo tempo (Fig 8a). Nesta última, os vacúolos fagocíticos marcados apresentaram-se distribuídos por todo o citosol, seja de forma dispersa ao nível da periferia celular interna, seja mais aglomerados nas regiões perinucleares. Padrão distinto foi observado para a crotoxina nativa, onde se evidenciou a maioria das escassas marcações concentradas na periferia celular interna.

Nos demais tempos, observou-se, para a crotoxina nativa, um aumento significativo da marcação demonstrando, assim, uma possível cinética de endocitose da toxina pelos macrófagos. A esse nível, observou-se um aumento de concentração dos vacúolos fagocíticos nas regiões perinucleares (Fig 7b-d). Quanto a forma irradiada da toxina a marcação, já fortemente evidente no início do ensaio (15 minutos), acentuou-se gradativamente até o final (60 minutos) (Fig 8a-c), mantendo o mesmo padrão anteriormente descrito.

2.2.2.2- Veneno Total Nativo ou Irradiado

O veneno total nativo foi pobremente reconhecido pelos macrófagos, mesmo no tempo máximo de incubação (60 minutos) (Fig 9c), visto que as poucas marcações evidenciadas em vacúolos fagocíticos não eram compartilhadas por todas as células aderidas. Além disso, não se observou um aumento gradativo da endocitose, sugerindo, dessa forma, a ausência de uma cinética nesse fenômeno levando em consideração os tempos analisados.

Figura 9

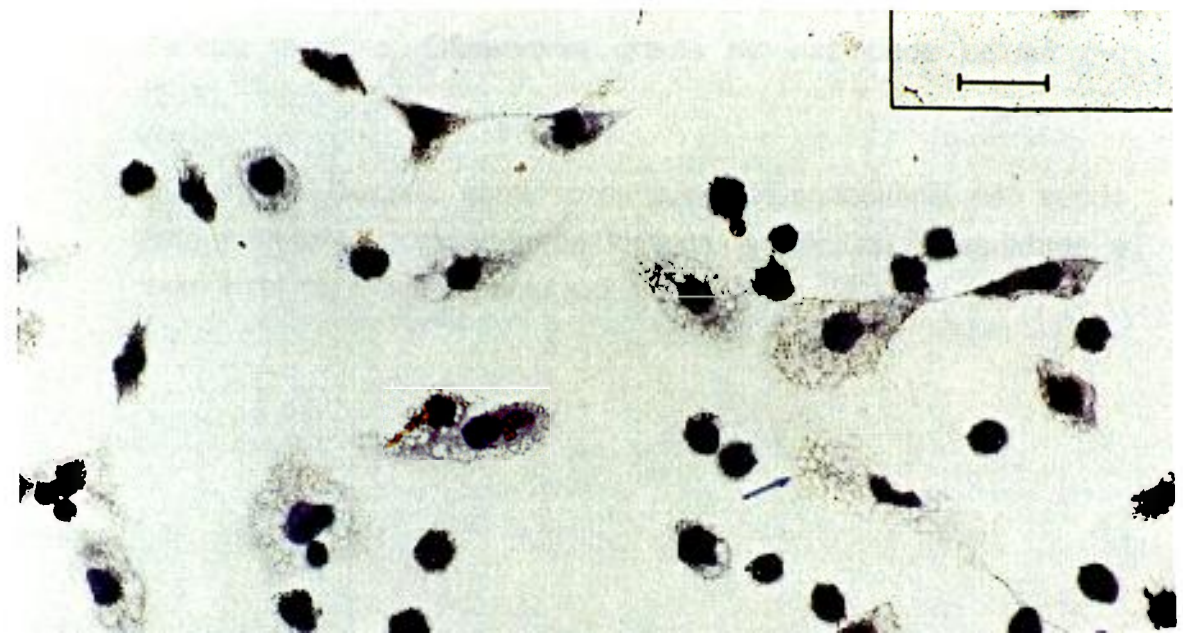
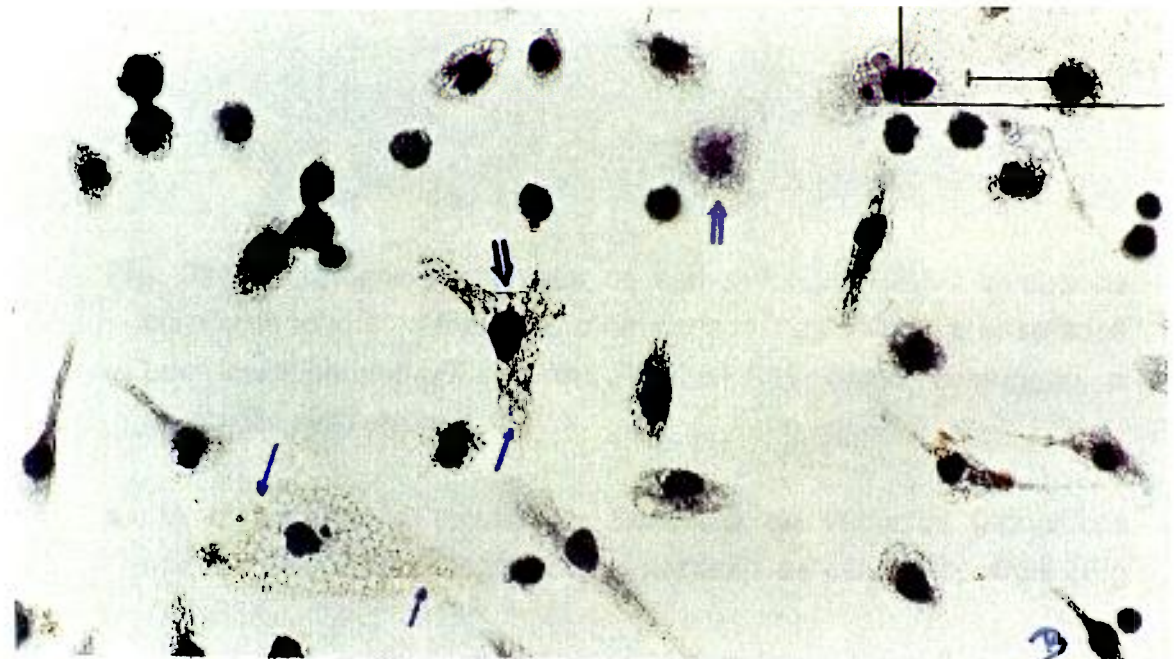
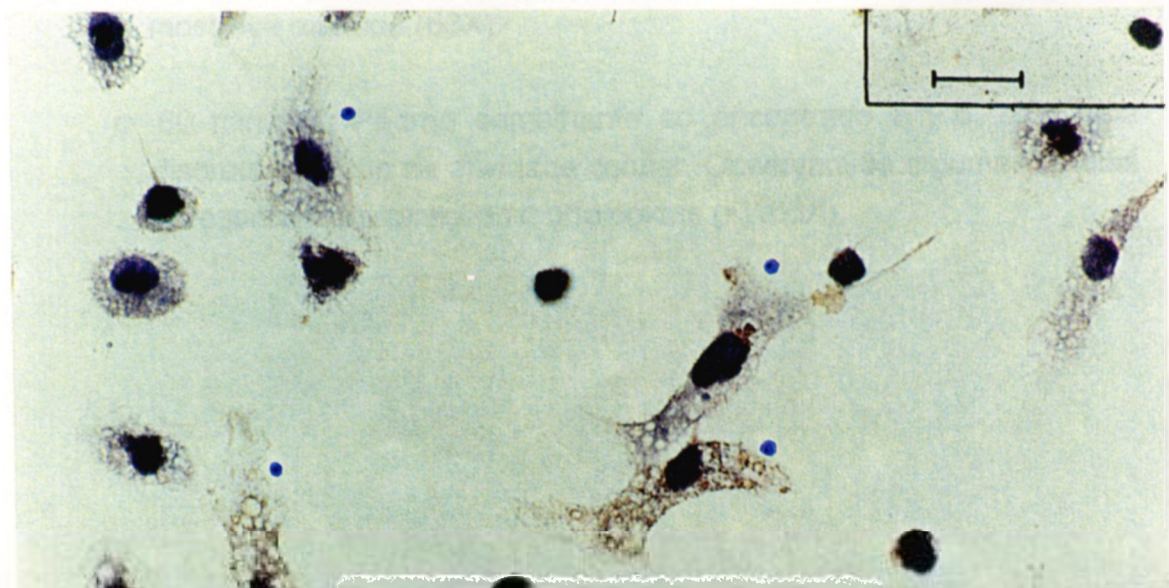
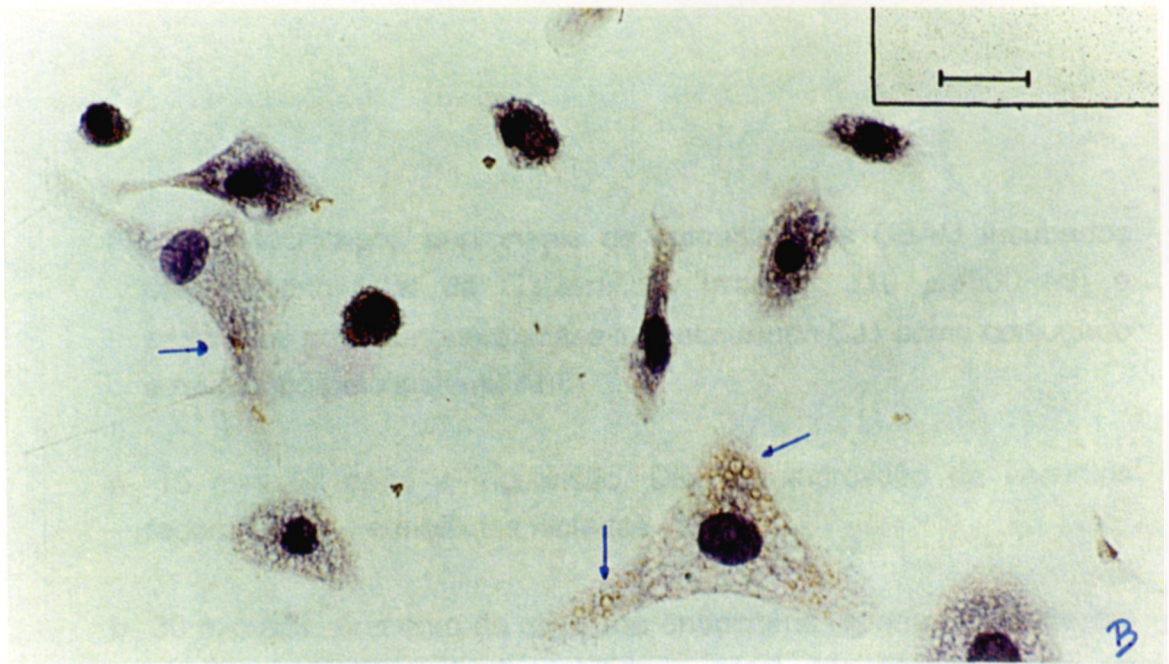
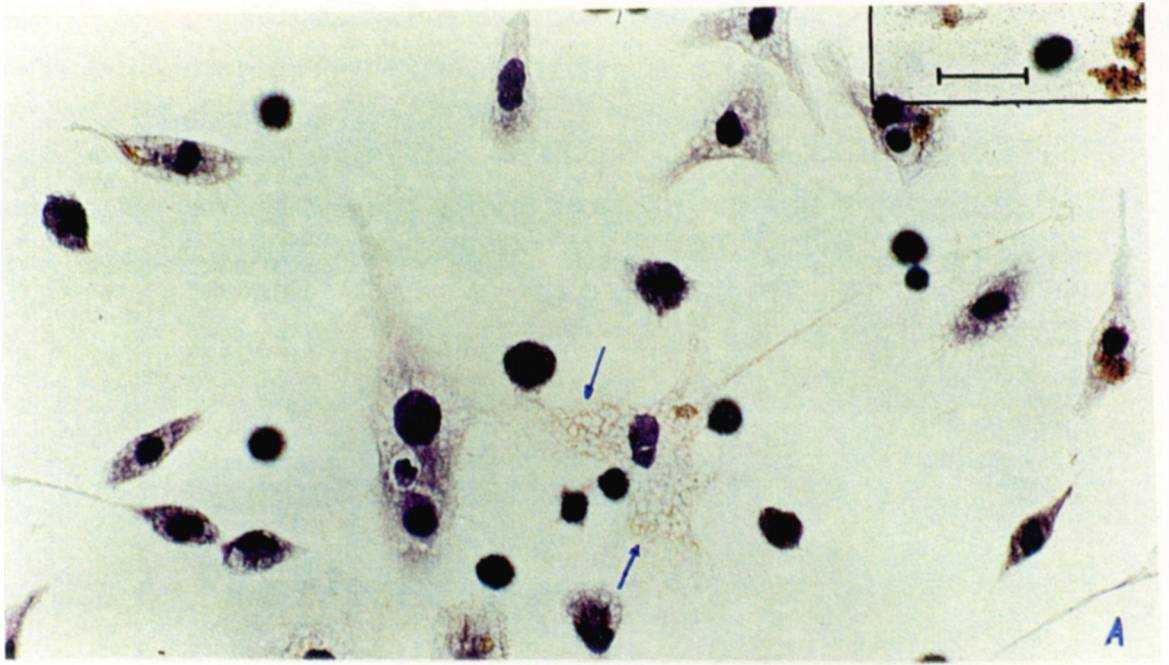


Fig. 09- Macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J incubados com veneno total nativo de *C.d.terrificus* (10 μ g/500 ml) e ensaiados por imunoperoxidase indireta, tendo CJ1 como conjugado e revelação pelo sistema ABC.

- a- 15 minutos após incubação. Escassez de vacúolos fagocíticos marcados, sendo considerado semelhante as células controle (Fig 7A) (63X).
- b- 30 minutos. Algumas células mostrando marcações (\rightarrow), sendo a maioria negativa. Observa-se queda na viabilidade celular (\Rightarrow) (63X).
- c- 60 minutos. Discreto aumento de atividade endocitária, não sendo esta, entretanto, compartilhada por todas as células. A viabilidade, a esse nível, foi extremamente reduzida (63X).

Figura 10



algumas células (→). A visibilidade geral das células

Fig 10- Macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J incubados com veneno total de *C.d.terrificus* irradiado (10 μ g/500 ml) e ensaiados por imunoperoxidase indireta, tendo CJ1 como conjugado e revelação pelo sistema ABC.

a- 15 minutos após a incubação. Discreta marcação de vacúolos fagocíticos (\rightarrow) em células isoladas (63X).

b- 30 minutos. Aumento da atividade endocitária, apenas evidente em algumas células (\rightarrow). A viabilidade geral das células ainda se mostrava mantida (63X).

c- 60 minutos. Padrão semelhante ao encontrado em **b**, com uma discreta redução na atividade celular. Observam-se algumas células apresentando alterações morfológicas (\bullet) (63X).

O veneno total irradiado foi prontamente reconhecido pelos macrófagos aos 15 minutos de ensaio (Fig 10a), apesar de que, nas preparações, nem todas as células se mostravam positivas à marcação. Apesar disso, evidenciou-se um aumento na marcação nos tempos subseqüentes (Fig 10b-c), mostrando um maior reconhecimento desta forma do veneno total pelos macrófagos em comparação com a forma nativa. Mesmo assim, essa resposta se mostrou inferior quando comparada à obtida com a forma irradiada da crotoxina (Fig 8 a-c).

V- DISCUSSÃO

Para atender aos nossos objetivos, necessitávamos do desenvolvimento de várias toxinas e reagentes que, como demonstramos em Resultados, apresentassem alta especificidade e capacidade de reconhecimento. Assim, pudemos demonstrar que a crotoxina purificada utilizada apresentava alto grau de pureza e reatividade, com agregação entre moléculas após a irradiação, conforme já descrito⁸⁹. Os conjugados desenvolvidos apresentavam alta sensibilidade e especificidade, e somente com o desenvolvimento destes reagentes, poderíamos alcançar a sensibilidade necessária para a detecção de quantidades ínfimas de toxinas, devido a dispersão normal que ocorre em ensaios *in vivo*⁵⁷. Foram testados outros métodos de detecção imunohistoquímica, como o método de imunoperoxidase indireta e o de complexo peroxidase-antiperoxidase, que se revelaram trabalhosos e de eficiência no máximo semelhantes às técnicas empregadas.

Estudos eletrofisiológicos anteriores, que visavam a localização da ação destas toxinas, empregaram preparações isoladas, o que leva a resultados "modulados", devido a omissão de componentes normalmente encontrados *in vivo*, que poderiam cooperar sinergicamente, minimizar ou mesmo abolir a ação das toxinas sobre as preparações. Como consequência, pode-se obter resultados que são oriundos de uma superestimulação por parte de uma maior oferta de toxina aos órgãos de teste, como se observa nos ensaios envolvendo preparações eletrofisiológicas utilizando toxinas¹¹⁰. A nossa opção por técnicas imunohistoquímicas de alta eficiência visou a eliminação deste aspecto.

Nos ensaios com crotoxina nativa, encontramos junções neuromusculares marcadas, mostrando uma localização e ação tempo-dependente nesse sítio do músculo estriado esquelético. Tais achados corroboram dados de outros autores¹⁸ a respeito de uma preferência da crotoxina por junções neuromusculares e uma ação cinética da ação fosfolipásica, como observado eletrofisiologicamente¹¹⁰. Este encontro também corrobora os achados de Lomba (1969)⁸⁰ e Nascimento (1991)⁸⁹, que analisaram a biodistribuição de crotoxina submetida a iodação, encontrando uma concentração da toxina em músculo esquelético. Já houve descrição de alterações morfológicas induzidas por crotoxina em junções neuromusculares, mas utilizando sistemas que poderiam ocasionar uma maior concentração tecidual, como injeção intramuscular e análise do local da injeção⁴⁸. Este tipo de estudo apresenta as mesmas restrições dos estudos eletrofisiológicos, ou seja, maiores níveis de toxina do que o esperado nos ensaios *in vivo*.

Na análise dos demais órgãos dos animais inoculados com crotoxina nativa, não encontramos marcações significativas, exceto em borda em escova dos túbulos renais, também de forma tempo dependente. Entretanto, não observamos alterações morfológicas a esse nível que fossem sugestivas de uma ação direta da toxina. Estes dados corroboram os achados de Lomba (1969)⁸⁰ e Nascimento (1991)⁸⁹, que demonstraram que o rim é o principal órgão de clareamento da toxina. Embora existam descrições de insuficiência renal aguda em pacientes de acidentes crotálicos, estas lesões renais foram atribuídas secundariamente à liberação de mioglobina e não a uma ação direta da toxina¹¹. Experimentalmente, entretanto, apesar da presença de uma atividade miotóxica evidente, que pode ser determinada por níveis elevados de creatina quinase⁷⁶, não se observam alterações renais, principalmente em consequência de diferenças morfofisiológicas inerentes aos tecidos renais, murino e humano. Além disso, os animais vêm a óbito precocemente, como consequência de uma ação da crotoxina sobre a inervação nervo frênico-diafragma, bem como sobre a musculatura intercostal¹³³.

Em nossos experimentos utilizando crotoxina irradiada e um sistema imunohistoquímico de revelação, não encontramos marcações em junções neuromusculares e também nenhum quadro neurotóxico foi observado nos animais tratados com esta dosagem da toxina irradiada. Diante dos nossos achados de EGPA-SDS, evidenciando a presença significativa de agregados anteriormente descritos⁸⁹ na crotoxina irradiada, podemos supor que a radiação induziu alterações de quantidade e qualidade da toxina ativa na amostra testada, levando a uma menor concentração no sítio específico, o que dificultou a sua detecção tecidual pelo limite de resolução dos métodos empregados. Embora Gopalakrishnakone (1979) *apud* Hawgood (1982)^{60a}, tenha detectado em junções neuromusculares, altas concentrações de crotoxina reconstituída, em imuno-eletrônica, a radiação deve alterar a crotoxina de forma diferente da utilizada por aqueles autores, talvez na forma de uma inibição irreversível da atividade fosfolipásica isolada, não sendo possível a comparação entre estes achados.

Os achados obtidos por microscopia eletrônica não mostraram alterações significativas da célula muscular esquelética, sugerindo que esta poderia estar preservada nas fases iniciais do envenenamento agudo utilizado em nosso modelo. Os efeitos identificáveis de agressão pela toxina, como degeneração de membranas e mitocôndrias, são observados em períodos posteriores do envenenamento⁴⁹. O sítio específico de ação, a junção neuromuscular, não pôde ser observada pela amostragem utilizada. Na análise imuno-eletrônica de

musculatura estriada esquelética não foram encontradas junções neuromusculares nos vários materiais testados. Entretanto, pudemos observar marcações em sistema T da célula muscular, sugerindo ser este um dos meios de dispersão e internalização da crotoxina. Assumindo-se que a crotoxina exerce sua ação tóxica por reconhecimento e posterior lesão da junção neuromuscular, para alcançar tal sítio, seu caminho seria a passagem do plasma para o espaço intercelular, para então alcançar e concentrar-se em junções neuromusculares. Nessas junções, pelo reconhecimento do receptor específico em membranas pré-sinápticas⁷⁵ e posterior liberação da subunidade crotapotina, a fosfolipase liberada poderia interagir com a membrana pós-sináptica e alcançar o sistema T da fibra muscular, podendo, então, ser detectada a este nível. Um outro caminho possível, após o espaço intercelular, seria a permeação da célula muscular diretamente pelo complexo crotoxina, sendo que o sistema T seria um elemento de transporte celular, levando o complexo para junção neuromuscular a partir da célula muscular. Gopalakrishnakone (1979) *apud* Hawgood (1982)^{60a} demonstrou, por imuno-eletrônica, a presença de crotoxina reconstituída em junções neuromusculares de camundongos, por meio de um sistema de imunoperoxidase indireta, com subsequente revelação por detecção da atividade peroxidásica. Entretanto, este autor utilizou em seus ensaios amostras de crotoxina reconstituída após alterações produzidas na sua subunidade fosfolipásica por meio de modificações no aminoácido histidina, processo esse que induz alterações na atividade enzimática desta subunidade. Isso tem como consequência uma diminuição da neurotoxicidade, baseado no fato de que as atividades tardias da fosfolipase sobre a porção pré-sináptica de junções neuromusculares são dependentes da atividade catalítica desta enzima sobre os fosfolípidos presentes neste sítio, podendo gerar uma concentração local artefactual. Nosso experimento demonstrou a crotoxina em junções neuromusculares utilizando um sistema semelhante, mas sem alterações químicas da molécula nativa.

O encontro, nos animais inoculados com crotoxina irradiada, de marcação em sistema T da célula muscular sugere dois processos. O primeiro seria o fato de que esta toxina não mais apresenta a capacidade de reconhecer o seu receptor sináptico⁷⁵, sendo assim rapidamente drenada, interiorizada e concentrada no sistema T. O segundo, seria dependente da concentração menor de crotoxina ativa na fração irradiada, com maior sensibilidade do método imuno-eletrônico, que permitiria a detecção qualitativa mais sensível que o método imunohistoquímico. Assim, o encontro desta forma da toxina por Nascimento (1991)⁸⁹ em musculatura estriada esquelética quando da análise de sua

biodistribuição talvez se deva, pelo menos em parte, à presença da toxina restrita à microvasculatura e sistemas de condução da célula muscular, permanecendo dispersa até que fosse processado o seu clareamento, ou mesmo a sua eliminação por parte de fagócitos circulantes.

A radiação ionizante é tida como boa ferramenta no sentido de se destoxicar venenos de serpentes^{54,89,100,114,120}. Existem evidências de que antígenos pouco imunogênicos, quando submetidos à ação da radiação gama, por quebras moleculares e novas ligações inter e intracadeias, expõem maior número de epítomos¹³⁹ que podem, dessa forma, ser alvo de células do sistema imunológico levando à produção de anticorpos mais capazes de neutralizar, tanto a forma irradiada para o qual são específicos, quanto à forma nativa. Nascimento (1991)⁸⁹ observou uma maior eficiência de neutralização da crotoxina nativa ou irradiada quando usou anticorpos produzidos contra a forma irradiada da toxina. Além disso, esses anticorpos foram capazes de reconhecer também a forma nativa da toxina, bem como possibilitar uma proteção quando os animais foram imunizados contra crotoxina irradiada e desafiados com a forma nativa da toxina.

Algumas hipóteses acerca de como a radiação altera o comportamento fármaco-enzimático da crotoxina podem ser levantadas em concordância com nossos resultados. É geralmente aceito que a neurotoxicidade da crotoxina depende da dissociação de suas subunidades, imediatamente após o encontro do receptor específico em pré-sinapse⁷⁵, e que o processo de agressão da fosfolipase sobre a junção neuromuscular é uma consequência de suas atividades farmacológica e catalítica. Essas subunidades são mantidas unidas por ligações iônicas, passíveis de dissociação. Experimentos utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidroclorato de carbodiimida⁷⁸, que torna essa ligação covalente, têm demonstrado a abolição de mais de 95% da atividade fosfolipásica da amostra tratada, justificando, assim, a necessidade de dissociação para uma ação tóxica plena da toxina. A radiação, por sua vez, poderia promover a fixação das ligações entre as subunidades, por meio de novas ligações inter e intramoleculares, dificultando, ou até impossibilitando, a sua dissociação. Outra hipótese possível seria a ação da radiação de uma forma sítio-dirigida. Levando em consideração a hipótese de Kini & Evans (1989)⁷⁵ a respeito da existência de sítios enzimático e farmacológico dispostos de forma dissociada na molécula de fosfolipases A₂, a radiação ionizante poderia promover alterações moleculares em ambos os sítios da crotoxina, impossibilitando que esta reconhecesse seu receptor farmacológico no sítio juncional ou eliminando a sua atividade catalítica através do bloqueio do sítio enzimático, impedindo que fosfolípidos pré- e pós-juncionais pudessem ser consumidos, o que explicaria a ausência de efeitos

neurotóxicos quando agregados de crotoxina irradiada são utilizados como desafio em camundongos⁸⁹. A relativa neurotoxicidade da crotoxina irradiada, obtida através da determinação da dose letal média, poderia ser explicada, talvez, pela presença de crotoxina ativa na mistura irradiada a 2000Gy, visto ser a produção de agregados diretamente proporcional à taxa de dose de radiação empregada na destoxicação³⁰. Isto corrobora, portanto, nossa segunda hipótese, da existência de uma menor concentração de toxina ativa na fração irradiada, o que justifica a ausência de marcação imunohistoquímica em junções neuromusculares quando esta fração foi utilizada.

Os estudos imunohistoquímicos em outros órgãos, como o fígado e o baço, não mostraram marcações significativas diferente do que foi demonstrado por Nascimento (1991)⁸⁹ com uma concentração relativa da crotoxina, tanto nativa como irradiada, nestes órgãos. Em nossos ensaios, a dispersão da toxina por órgãos parenquimatosos de grande massa ultrapassou os limites de detecção dos métodos empregados, impedindo uma avaliação da participação destes órgãos através deste tipo de ensaio.

Estes órgãos são ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, células iniciadoras da resposta imune. Partindo dessa premissa, a escolha de um imunógeno, que seja prontamente reconhecido por essas células, a princípio, consiste em etapa fundamental, quando se objetiva uma produção otimizada e permanente de anticorpos. Experimentos anteriores⁸⁹, utilizando crotoxina irradiada, mostraram que a produção de anticorpos a partir desse produto é satisfatória, tanto quantitativamente, pois uma maior concentração é obtida, quanto qualitativamente, pelo fato de que os anticorpos anti-crotoxina irradiada têm a capacidade de reconhecer, até com maior eficiência, a forma nativa do imunógeno.

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e são produzidos na medula óssea. Após isso, ganham a corrente sanguínea, alcançando diferentes órgãos nos quais se instalam como células residentes, adquirindo especializações segundo o órgão de instalação. Na corrente sanguínea são em menor número, mas monócitos, que também pertencem a esse sistema, têm a capacidade e o destino de se diferenciar em macrófagos em condições especiais. Assim, uma das maiores funções dos macrófagos é dar assistência na inicialização e finalização da resposta imune mediada por células frente a diferentes antígenos. Após um período de interação breve com o antígeno, o macrófago ingere o mesmo, processando-o no seu interior, reciclando e expressando o produto na superfície de sua célula em associação com glicoproteínas, que são codificadas por gens do complexo de

histocompatibilidade principal (MHC). Esse processo caracteriza os macrófagos como células apresentadora de antígenos, fundamentais no que tange à posterior produção de anticorpos, bem como a instalação de uma memória imunológica¹⁰.

Em nossos experimentos, utilizando macrófagos peritoneais, observamos um maior reconhecimento das formas irradiadas das amostras por parte dessas células, quando se compara com as formas nativas. A melhor resposta, entretanto, foi obtida quando a crotoxina irradiada foi utilizada. Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, por uma maior concentração, nesta última, de agregados produzidos pela radiação que correspondem a 50-60% do total da amostra irradiada (Nascimento, 1993-Com.Pessoal), em comparação com o veneno total irradiado, que contém cerca de 11% de agregados³⁰, quando ambas as amostras recebem a mesma dose. O reconhecimento da crotoxina irradiada por parte de macrófagos talvez se deva a interações não mediadas por receptores celulares, sendo a endocitose processada de uma forma inespecífica. A presença de um receptor específico em macrófagos para um determinado epítopo da crotoxina irradiada, poderia ser limitante no que se refere à dose de radiação a ser empregada na produção de agregados, uma vez que um aumento na taxa de dose de radiação poderia determinar a destruição destes epítomos na crotoxina irradiada, impossibilitando o seu pronto reconhecimento por estas células.

As diferenças encontradas nas quantidades de agregados presentes nas amostras de crotoxina ou veneno total irradiados refletem a teoria da radioproteção de Skalka & Antoni (1970)¹¹⁸, que demonstraram haver proteção mútua entre os componentes de uma mistura protéica, o que não foi observado quando proteínas purificadas foram utilizadas. Esse fenômeno leva a uma menor destoxicação do veneno total, como observado por Nascimento (1991)⁸⁹, que mostrou ser esta 3 vezes menor quando comparado com a crotoxina purificada, quando ambos recebem a mesma dose. Isso pode explicar a viabilidade diminuída dos macrófagos ensaiados com veneno total irradiado, sugerindo que uma ação de enzimas ou toxinas ainda ativas presentes no veneno irradiado poderiam estar comprometendo a integridade destas células. Assim, a baixa concentração de agregados e a presença de substâncias ativas presentes no veneno total irradiado a 2000Gy o contra-indicam como imunógeno ideal nos processos de imunização. Talvez, como observado por Clissa e colaboradores (1994)³⁰, um aumento da taxa de dose de radiação possa ser útil no que se refere à produção de um melhor imunógeno a partir do veneno total.

Através dos dados obtidos, demonstramos que a crotoxina irradiada não produz alterações morfológicas nos órgãos de clareamento (fígado e rim), sendo

perfeitamente eliminada por esses órgãos. Os dados de imunohistoquímica em animais inoculados com a forma irradiada da crotoxina também demonstraram que esta última não promove alterações em junções neuromusculares. Esses dados demonstram a eficiência da radiação gama em atenuar a atividade tóxica da crotoxina, bem como determinar o seu pronto reconhecimento por parte de fagócitos, levando a uma maior resposta mediada por anticorpos, o que sugere, fortemente, a sua utilização como imunógeno de eleição na produção de soros específicos, experimentais ou heterólogos para uso humano.

VI- CONCLUSÕES

GERAIS

1- A radiação gama produz alterações na molécula de crotoxina, fazendo com que esta perca a sua capacidade de interação com sítios específicos em junção neuromuscular, aumentando a sua afinidade por macrófagos peritoneais *in vitro*, o que a torna um imunógeno melhor na produção de anti-soros.

2- A preservação das propriedades imunogênicas e antigênicas da crotoxina irradiada, evidenciada pela produção satisfatória de anticorpos, provavelmente se deve ao maior reconhecimento por macrófagos dos agregados produzidos quando da irradiação da toxina.

3- Tanto a crotoxina nativa quanto a irradiada não induziram, nos tempos estudados, alterações morfológicas compatíveis com lesões dos órgãos vitais ao clareamento e destoxicação, mesmo quando ministradas em doses elevadas.

ESPECÍFICAS

- 1) A crotoxina nativa pode ser detectada imunohistoquimicamente em junção neuromuscular de camundongos CBA/J, experimentalmente inoculados.
- 2) A ligação da crotoxina nativa em junção neuromuscular, detectada por imunohistoquímica, mostrou ser um processo tempo-dependente, com alterações morfológicas a esse nível.
- 3) Após irradiação com 2000Gy, a crotoxina não mais se ligou a junções neuromusculares, não sendo detectada pela técnicas utilizadas.
- 4) Tanto a crotoxina nativa como a irradiada foram detectadas em órgãos de excreção de forma tempo-dependente.
- 5) Em imuno-eletrônica, pudemos detectar ambas as formas da crotoxina em sistema T de musculatura estriada esquelética.
- 6) Em sistema de viabilidade *in vitro* e imunohistoquímica de macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J, observamos que:
 - a- A crotoxina nativa mostrou menor internalização e alta agressão aos macrófagos, demonstrando alterações morfológicas nestes últimos.
 - b- Após a irradiação, a crotoxina apresentou maior internalização e menor agressão aos macrófagos desafiados.
 - c- O veneno total, nativo ou irradiado, mostrou maior agressão a macrófagos e menor internalização, quando comparado a toxina isolada em ambas as formas.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, G.E.; ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L.; WILLSON, R.L., (1972), Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. *Radiat. Res.*, **49**:278-289.
2. AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G., (1985), Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, **24**:7054.
3. ALVARES, J.M., (1980), Tratamento intensivo da paralisia respiratória no acidente crotálico. Belo Horizonte, 54p. (Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina - UFMG).
4. AMARAL, A., (1977), Serpentes do Brasil - Iconografia Colorida. São Paulo. Melhoramentos.
5. AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOUYOUMDJIAN, L.A.; CARDOSO, J.L.C.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; LOPES, P.F.A., (1987), Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde.
6. AMARAL, C.F.S.; RESENDE, N.A.; PEDROSA, T.M.G.; DA SILVA, O.A.; PEDROSO, E.R.P., (1988), Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, **30**:288-292.
7. AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S., (1986), Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo*, **28**(4):220-227.
8. AMORIM, M.F. & MELLO, O, (1954), Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. *Am.J.Path.*, **3**:479-499.
9. AMORIM, M.F., (1971), Intermediate nephron nephrosis in humans and experimental crotalic poisoning IN: Bucherl, W & Buckley, E., (eds), Venomous Animals and Their Venoms . Vol II, pp 319-343 Academic Press, N.Y.
10. AUGER, M.J. & ROSS, J.A., (1992), The Biology of Macrophage IN: Lewis, C.E. & McGee, J.O'D., (eds), The Natural Immune System - The Macrophage - IRL Press, Oxford Univ.Press, 1992, p.3-74.
11. AZEVEDO-MARQUES, M.M., COIMBRA, T.M., LAURE, C.J., LACHAT, J., FUJII, A.A., (1986a), Ação miotóxica sistêmica do veneno crotálico total crotamina positivo (VCTM+) e crotamina negativo (VCTM-). *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19S**:abs 012.
12. AZEVEDO-MARQUES, M.M., CUPO, P., HERING, S.E., (1986b), Detecção precoce da mioglobina em acidente crotálico humano. *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19S**:abs 010.
13. AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, H.E.; CUPO, P., (1987), Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South american rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, **25**(11):1163-1168.

14. BARIDE, R.M., JAIN, S.D., GAITONDE, B.B., (1980), Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J. Med. Res.*, **72**:571-576.
15. BARRABIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A, (1978), Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. IN: Rosemberg, P, (ed.), Animal, Plant and Microbial Toxins, pp.113-133, Pergamon Press, Oxford.
16. BICALHO, R.X.; ROCHA, O.A.; HENEINE, L.G.D.; MAGALHÃES, A.; HENEINE, I.F., (1990), The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **28**(2):171-179.
17. BIEBER, A.L.; McPARLAND, R.H.; BECKER, R.R., (1987), Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor*. *Toxicon*, **25**:677-680.
18. BON, C., RADVANYI, F., SALIOU, B., FAURE, G., (1986), Crotoxin: A biochemical analysis of its mode of action. *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, **5**(2):125-138.
19. BON, C.; CHANGEUX, J.F.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H., (1979), Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, **99**:471-481.
20. BRADFORD, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248.
21. BREITHAUPT, H., (1976), Enzymatic characteristics of the *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon*, **14**:221-233.
22. BREITHAUPT, H., (1976), Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotapotin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **292**:271-278.
23. BRUNIE, S.; BOLIN, J.; GEWIRTH, D.; SIGLER, P.B., (1985), The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.*, **260**:9742-9749.
24. BUTLER, J.; HOEY, B.M.; SWALLOW, A.J., (1987), Radiation chemistry. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, **83**:129-175.
25. CAMERON, D.L. & TU, A.T., (1978), Chemical and functional homology of myotoxin a from Prairie Rattlesnake venom and crotamine from South american rattlesnake venom. *Biochem. biophys. Acta*, **532**:147-154.
26. CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ROGERO, J.R., ANDRADE Jr, H.F., (1992), Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **25**:905.
27. CHANG, C.C., (1985), Neurotoxins and phospholipase activity in snake venoms. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC.*, **9**:126-142.
28. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M., (1971a), Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus* -I- *Toxicon*, **9**:279-286.

29. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M., (1971b), Action neuromusculaire comparée de la crotoxine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus* -II- *Toxicon*, **9**:286-289.
30. CLISSA, P.B., NASCIMENTO, N., ANDRIANI, E.P., SANALIOS, R.B., ROGERO, J.R., (1994), Análise cromatográfica e biológica dos produtos oriundos da irradiação do veneno crotálico, IX Reunião Anual da FESBE, 25.3ABS:403, Caxambu, MG, 1994
31. CLYDE, D.F., (1990), Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):9-12.
32. COSTA, L.M., TAKEDA, A.K., BARBOSA, S.F.C., BERRA, J.A.P., ADELINO, M.G.F., SOERENSEN, B., PINTO, J.R., VANCETTO, M.D.C., (1985), Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus in natura*, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. *Vac.Soros*, **1**:24-29.
33. COSTA, T.A., (1988), Efeitos da Radiação ionizante na crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, SP. (Dissertação de Mestrado - IPEN-USP)
34. CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E., (1988), Clinical and laboratory features of South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **82**:924-929.
35. CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E., (1990), Acute myocardial infarction-like enzyme profile in humans victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **84**:447-451.
36. DANZIG, L.E. & ABELS, G.H., (1961), Haemodialysis of acute renal failure following rattlesnake bite, with recovery. *J.Am.Med.Ass.*, **175**:136-137.
37. DERTINGER, H. & JUNG, H., (1970), The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. IN: Dertiger, H. & Jung, H, (eds), *Molecular Radiation Biology*. Ch.9, p.115-133. Berlin, Springer-Verlag, 1970.
38. DIJKSTRA, B.W.; KALK, K.H.; HOL, W.G.J.; DRENTH, J., (1981), Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 resolution. *J.Mol.Biol.*, **147**:97-123.
39. DIJKSTRA, B.W.; RENETSEDER, R.; KALK, K.H.; HOL, W.G.J.; DRENTH, J., (1983), Structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ at 2.6 resolution and comparison with bovine pancreatic phospholipase A₂. *J.Mol.Biol.*, **168**:163-179
40. DUNCAN, C.J., (1978), Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: A strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia*, **34**:1531.
41. FARRAGI, M.; KLAPPER, M.H.; DORFMAN, L.M., (1978), Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical mode of electron migration. *J.Phys.Chem.*, **82**(5):508-512.
42. FLOWERS, H.H., (1966), Effects of X-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* (Cottonmouth Moccasin) venom. *Toxicon*, **3**:301-304.

43. FOX, J.W.; ELZINGA, M.; TU, A.T., (1979), Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin *a* isolated from the venom of Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, **18**:678-684.
44. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B., (1956), Fractionation and composition of crotoxin. *Archs. Biochem.*, **60**:64-73.
45. GARRISON, W.M., (1987), Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.*, **87**:381-398.
46. GONÇALVES, J.M., (1956), Purification and properties of crotoamine. IN: Buckley, E.E. & Porges, N., (eds), Venoms. No 44, pp 261-273, Washington: Am. Assoc. Adv. Sci.
47. GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G., (1950), Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras - I - Análise eletroforética. *An. Acad. bras. Cienc.*, **22**:141-149.
48. GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B.J., (1984), Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction, *Toxicon*, **22**(5):791.
49. GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y., (1984), Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon*, **22**:85-98.
50. GRALÉN, N. & SVEDBERG, T., (1938), The molecular weight of crotoxin. *Biochem. J.*, **32**:1375
51. GRASSET, E., (1945), Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. *Trans. Royal Soc. trop. Med. Hyg.*, **38**:463-488.
52. GRILLO-RODRIGUES, O. & SCANNANE, H.R., (1976), Detoxification of fraction of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*, **14**:400-401.
53. GROSH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E., (1979), Biological effects of radiation. 2nd ed., New York, Academic Press.
54. GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y., SOUZA Fo, J.M., NASCIMENTO, N., ROGERO, J.R., (1990), Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation IN: Int. Soc. Toxinol. Pan American Section III. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins. Mexico, 1990, p.32.
55. GUIDOLIN, R., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G., CARICATI, C.P., LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F., PINTO, J.R., MARCELINO, J.R., (1989), Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos borópicos e crotálicos tratados com glutaraldeído. *Mem. Inst. Butantan*, **51**:85-90.
56. HABERMANN, E. & BREITHALPT, H., (1978), The crotoxin-complex - An example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*, **16**:19-30.
57. HABERMANN, E.; WALSH, P.; BREITHALPT, H., (1972), Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **273**:313-330.
58. HANLEY, M.R., (1987), Crotoxin effects on *Torpedo californica* cholinergic excitable vesicles and the role of its phospholipases A activity, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **82**:392-401.
59. HARLOW, E. & LANE, D., (1988), Antibodies. A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Lab, N.Y.

60. HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A.; MacDONELL, C.A., (1979), Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. IN: Eaker, D & Wadström, t., (eds), *Natural Toxins. Pro. 6th Int.Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins*, p.569-578, Uppsala, Pergamon Press.
- 60a. HAWGOOD, B.J. (1982) Physiological and Pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: Tu. A.T. (ed) - *Rattlesnake venoms*, pp 121-162, Marcel Dekker Inc., New York.
61. HAWGOOD, B.J. & SMITH, I.C.H., (1989), The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, **27**:272-276.
62. HAWGOOD, B.J., SMITH, I.C.H., STRONG, P.N., (1988), Early induction by crotoxin of biphasic frequency changes and giant miniature endplate potentials in frog muscle. *Br.j.Pharmacol.*, **94**:765-772.
- 62a. HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H., (1971), Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **68**:1560-1567.
63. HENDON, R.A & TU, A.T., (1979), The role of crotoxin subunits in Tropical Rattlesnake. *Biochem.Biophys.Acta*, **578**:243-252.
64. HERRINGTON, D.A.; CLYDE, D.F.; DAVIS, J.R.; BAQAR, S.; MURPHY, J.R.; CORTESE, J.F.; BANK, R.S.; NARDIN, E.; DIJOHN, D.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; TORRES, J.R.; MURILLO, J.; CORTESIA, M.; STURCHLER, D.; HOLLINGDALE, M.R.; LEVINE, M.M., (1990), Human studies with synthetic peptide sporozoite vaccine (NANP)₃-TT and immunization with irradiated sporozoites. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):33-37.
65. HOGE, A.R. & ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L., (1978/79), Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil - 2ª ed - *Mem.Inst.Butantan*, **42/43**:373-499.
66. HOMMA, M. & TU, A.T., (1971), Morfology of local tissue damage in experimental envenomation, *Br.J.Exp.Pathol.*, **52**:538.
67. HSU, S-M, RAINE, L., FANGER, H., (1981), Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Biochem.*, **29**:577-580.
68. HSU, S.-M., (1990), Immunohistochemistry IN: Wickek, M. & Bayer, E.A. (eds), *Avidin-Biotin Technology*, Chapter 39, *Meth.Enzymol.*, **184**:357-363
69. IWANAGA, S., TAKAHASHI, H., SUZUKI, T., (1976), Proteinase inhibitors from the venom of Russell's Viper. *Meth.Enzymol.*, **45**.
70. JACQUET, P.; VANKERKOM, J.; LAMBIET-COLLIER, M, (1994), The female guinea pig, a useful model for the genetic hazard of radiation in man; preliminary results on germ cell radiosensitivity in foetal, neonatal and adult animals. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(3):357-367.
71. JAYANTHI, G.P. & VEERAKASAPPA GOWDA, T., (1988), Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, **26**:257.
72. JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A., (1990), Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev.Ass.Med.Bras.*, **36**(2):66-77.

73. JORGE, M.T.; PEREIRA, J.R.; BONFATI, J.R.; RIBEIRO, L.A.; AMATO NETO, V.; RASSI, I.E.; BOUABCI, A.S., (1986), Comportamento de enzimas e alterações anátomo-patológicas do músculo esquelético em pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*. *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19**(suppl.):27.
74. KAMIGUTI, A.S. & CARDOSO, J.L.C., (1989), Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. *Toxicon*, **27**:955-963.
75. KINI, M.R. & EVANS, H.J., (1989), A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon*, **27**(6):613.
76. KOUYOUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A., (1985), Muscle necrosis caused by subunits of crotoxin. *Toxicon*, **24**(6):575-583.
77. LAEMLI, U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**:680-685.
78. LENNON, B.W.; PLUMMER, D.; KAISER, I.I., (1990), Effects of subunit cross-linking on the properties of crotoxin. *Toxicon*, **28**(6):718-722.
79. LI, C.-H. & FRAENKEL-CONRAT, H., (1942), Eletrophoresis of crotoxin. *J.Am.Chem.Soc.*, **64**:1586.
80. LOMBA, M.G., (1969), Estudos sobre a distribuição e excreção da crotoxina-¹³¹I em cães. (Tese de Doutorado - Univesidade Estadual de Campinas, Campinas, SP).
81. LOPEZ, M.; FOSCARINI, L.; ALVARES, J.M.; DINIZ FILHO, I.; MARSA, V.D.; PROCÓPIO, N.P.M., (1972), Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. *Rev.Assoc.med.Minas Gerais*, **23**:107-112.
82. MAEDA, N.; TAMIYA, N.; PATTABHIRAMAN, T.R.; RUSSELL, F.E., (1978), Some chemical properties of the venom of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon*, **16**:431-441.
83. MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S., (1986), Rbdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, **28**:228-233.
84. MARTIN, C.C., (1925), The effect of formalin on snake venom -I- Diminution of toxicity of cobra venom. *Indian J.Med.Res.*, **12**:807-810.
85. MEIER, J., (1986), Individual and age-depend variations in the venom of the Fer-de-Lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon*, **24**:395.
86. MINTON, J.A. & WEINSTEIN, S.A., (1986), Geographic and ontogenic variation in venom of the Diamondback rattlesnake (*Crotaus atrox*). *Toxicon*, **24**:71.
87. MURATA, Y, NISHIKAWA, A.K., NASCIMENTO, N., HIGASHI, H.G., SILVA, W.D., ROGERO, J.R., (1990), Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities IN: Int.Soc.Toxinol. Pan American Section III. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins, Mexico, 1990, p.32.
88. NAKAZONE, A.K., ROGERO, J.R., GONÇALVES, J.J., (1984), Crotoxin - I - Immunology and interaction of the subunits. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **17**:119.

- 89.NASCIMENTO, N., (1991), Estudo comparativo entre crotoxina nativa e crotoxina irradiada - Aspectos bioquímicos e farmacológicos. (Dissertação de Mestrado - IPEN/CNEN-SP).
- 90.NUSSENZWEIG, R.S. et al, (1969), Specificity of protective immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Nature*, **222**:488-489.
- 91.OKONOGI, T., HATTORI, Z., OGIJO, A., MITSUI, S., (1979), Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527.
- 92.OWNBY, C.L., (1982), Pathology of rattlesnake envenomation IN: Tu, A.T. (ed), Rattlesnake Venom - pp 163-209 - Marcel Dekker, Inc., N.Y..
- 93.OWNBY, C.L., KAINER, R.A., TU, A.T., (1974), Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom, *Am.J.Pathol.*, **76**:401.
- 94.OWNBY, C.L.; BJARNASON, J.; TU, A.T., (1978), Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Am.J.Pathol.*, **93**:201.
- 95.OWNBY, C.L.; CAMERON, D.; TU, A.T., (1976), Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Am.J.Pathol.*, **85**:149.
- 96.PELLEGRINI FILHO, A; VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; LAURE, C.J., (1978), The action of crotamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. IN: Resenberg, P, ed., Toxins: Animal, Plant and Microbial. Proc. 5th Int. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins, pp.375-382. London, Pergamon Press.
- 97.POLAK, J. & VAN NOORDEN, S., (1984), An Introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems, Oxford Univ. Press, N.Y..
- 98.PRADO-FRANCESCH, J. & VITAL-BRAZIL, O.,(1981), Convulxin, a new toxin from the South american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, **19**(6):875-887.
- 99.PRADO-FRANCESCH, J; TAVARES, B.G.; HERTEL, R.; LOBO DE ARAÚJO, A., (1981), Effects of convulxin, a toxin from the rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. *Toxicon*, **19**:661-666.
- 100.PURANANANDA, C., (1972), Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization. Viena, Int.Atomic Energy Agency.
- 101.RADFORD, I.R. & MURPHY, T.K., (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):229-239
- 102.RADFORD, I.R., (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):203-215.
- 103.RADFORD, I.R.; MURPHY, T.K.; RADLEY, J.M.; ELLIS, S.L., (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):217-227

- 104.RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S., (1986), Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **19**:333-338.
- 105.RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B., (1985), A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J.Biol.Chem.*, **260**:11627-11634.
- 106.RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLENAVE, R.N.U.R., (1989), Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos, p.37. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde.
- 107.RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T., (1989), Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. *Rev.Hosp.Clín.Fac.Med.S.Paulo*, **44**(4):143-145.
- 108.RIBEIRO, L.A., (1990), Epidemiology of ophidic accidents. *Mem.Inst.Butantan*, **52**(suppl.):15-16.
- 109.RIECKMANN, K.H., (1990), Human immunization with attenuated sporozoites. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):13-16.
- 110.RODRIGUES-SIMIONI, L., HAWGOOD, B.J., SMITH, I.C.H., (1990), Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon*, **28**(12):1479-1489.
- 111.ROGERO, J.R., (1978), Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* - Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica Hidrogênio-Trício. (Tese Doutorado. Instituto de Química.USP).
- 112.ROSSI, M.A., PERES, L.S., DE PAOLA, F., CUPO, P., HERING, S.E., Azevedo-Marques, M.M., (1989), Microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by Tropical Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in humans, *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **113**:169.
- 113.RUBSAMEN, K., BREITHALPT, H., HABERMANN, E., (1971), Biochemistry and Pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **270**:274-288.
- 114.SALAFRANCA, E.S., (1973), Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*). *Int.J.Appl.Radiat.Isot.*, **24**:60.
- 115.SCHANNE, F.A.X.; KANE, A.B.; YOUNG, E.E.; FARBER, J.L., (1979), Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*, **206**:700.
- 116.SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A., (1980), Purification of gyroxin from a South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*, **18**:235-247.
- 117.SHORT, H.E. & MALLICK, S.M.K., (1935), Detoxification of snake venoms by the photodynamic action of methylene blue. *Indian J.Med.Res.*, **22**:529-536.
- 118.SKALKA, M. & ANTONI, F., (1970), Effect of radiation on the biological properties of proteins IN: Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. pp. 1-13, Ed. Int. Atomic Energy Agency.
- 119.SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, M., (1938), Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem.Inst.Butantan*, **12**:505-513.
- 120.SOUZA-FILHO, J.N., GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y., ROGERO, J.R., (1992), Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation, *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **25**:103-113.

121. STOCKER, K.F., (1990), Composition of snake venom IN: Stocker, K.F. (ed), Medical Use of Snake Venom Proteins, pp 33-57 CRC Press, Florida, 1990.
122. STRINGER, J.M.; KAINER, R.A.; TU, A.T., (1972), Myonecrosis induced by rattlesnake venom. *Am.J.Pathol.*, **67**:127.
123. STRONG, P.N., (1987), Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: Relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action IN: Dowdan, M.J. & Hawthorne, J.N., (eds), The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function, pp.534-549 . Chichester, Ellis Horwood.
124. SZUMIEL, I., (1994), Ionizing radiation-induced cell death. *Int.J.Radiat.Biol.*, **66**(4):329-341.
125. TABORSKA, E. & KORNALIK, F., (1985), Individual variability of *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*, **23**:612.
126. TABORSKA, E., (1971), Intraspecies variability of the venom of *Echis carinatus*. *Physiol.Bohemoslov.*, **20**:307.
127. TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A., (1970), The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, **8**:225-233.
128. THEAKSTON, R.D.G, LLOYD-JONES, M.J., REID, H.A., (1977), Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Lancet*, **2**:639-641.
129. TOWBIN, H. & GORDON, J., (1984), Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J.Immunol.Meth.*, **72**:313-340.
130. TU, A.T., (1983), Local tissue damaging (hemorrhage and myonecrosis) toxins from rattlesnake and other Pit Viper venoms. *J.Toxicol.Toxins Rev.*, **2**:205-234.
131. VARGAFTIG, B.B.; PRADO-FRANCESCH, J; CHIGNARD, M.; LEFORT, J.; MARLAS, G., (1980), Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cacaavella*. *Eur.J.Pharmacol.*, **68**:451-464.
132. VITAL-BRAZIL, O. & EXCELL, B.J., (1970), Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South american rattlesnake) on the frog junction. *J.Physiol.*, **212**:35.
133. VITAL-BRAZIL, O., (1966), Pharmacology of crystalline crotoxin -II- Neuromuscular blocking action. *Mem.Inst.Butantan*, **33**:991-992.
134. VITAL-BRAZIL, O., (1972), Neurotoxins from the South american rattlesnake. *J.Formosan Med.Assoc.*, **71**:394-400.
135. VITAL-BRAZIL, O., (1980), Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev.Ass.med.Bras.*, **26**:212-218.
136. VITAL-BRAZIL, O., EUGÊNIO, A.G.B., LASZLO, G.M., (1973), Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciência e Cultura*, **25**:1165-1169.
137. VITAL-BRAZIL, O.; FARIÑA, R.; YOSHIDA, L.; OLIVEIRA, V.A., (1986a), Pharmacology of crystalline crotoxin -III- Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem.Inst.Butantan Int.Symp.*, **33**:993-1000.

- 138.VITAL-BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J.; LAURE, C.J., (1979), Repetitive muscle responses induced by crotoxin. *Toxicon*, 17:61-67.
- 139.WALES, A. & KUSEL, J.R., (1992), Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. *Parasitology Today*, 8(11):358-363.
- 140.WHO, (1981), Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO, offset Publication No 58, Geneva.