

ATTENTION MICROFICHE USER,

The original document from which this microfiche was made was found to contain some imperfections that reduce full comprehension or some of the text despite the good technical quality of the microfiche itself. The failures may be:

- missing or illegible pages/figures;
- wrong pagination;
- poor overall printing quality, etc...

We normally refuse to microfiche such a document and request a replacement document (or page) from the national INIS Centre concerned. However, our experience shows that many months pass before such documents are replaced. Sometimes the Centre is not able to supply a better copy or, in some cases, the pages that were supposed to be missing correspond to a wrong pagination only. We feel that it is better to proceed with distributing the microfiche made of these documents than to withhold them till the imperfections are removed. If the removals are subsequently made then replacement microfiche can be issued. In line with this approach then, our specific practice for microfiching such documents is as follows:

1. A microfiche of an imperfect document will be marked with a special symbol (black circle) on the left of the title. This symbol will appear on all masters and copies of the document (1st fiche and trailer fiches) even if the imperfection is on one fiche of the report only.
2. If the incorrectnesses are not too general the reason will be specified on a sheet such as this, in the space below.
3. The microfiche will be considered as temporary, but sold at the normal price. Replacements, if they can be issued, will be available for purchase at the regular price.
4. A new document will be requested from the supplying Centre.
5. If the Centre can supply the necessary pages/document a new master fiche will be made to permit production of any replacement microfiche that may be required.

The original document from which this microfiche has been prepared has these imperfections:

- missing pages/figures numbered:
- wrong pagination
- poor overall printing quality
- combinations of the above
- other

Page 37, Fig. 12.

INIS Clearinghouse
I.A.E.A.
P.O. Box 100
A-1400, VIENNA
AUSTRIA

BR 9228246
INIS-BR - - 0850

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

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CROTOXINA NATIVA E IRRADIADA.
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS**

NANCI DO NASCIMENTO

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
Nuclear.**

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO

1991

*Ao meu pai "in memoriam",
minha mãe e
meus irmãos,
que me permitiram chegar até aqui e
a você, Heitor, que me faz continuar*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero,

orientador deste trabalho, pela confiança, incentivo, presteza e carinho dispensados

Aos Srs. Dr. Spero Penha Morato, Superintendente do IPEN, Dr. Roberto Fúlfaro, Diretor de Aplicações de Técnicas Nucleares, Dr. Orlando Rebelo dos Santos, Chefe da Divisão de Radiobiologia,
pela oportunidade e apoio na execução do trabalho

A Yoko Murata,

cuja dedicação e auxílio prestados foram imprescindíveis.

A Míriam Camargo Guarnieri,

pelo companheirismo e colaboração em todas as fases deste trabalho

A Ulysses Tomac Jr. e Ruth Weg,

pelo apoio e amizade

A Jayme Nunes de Souza Filho,

pela colaboração na fase inicial do trabalho,

A Carlos Muniz Filho,

pela amizade e apoio técnico constantes

A Emiko Muramoto,

pelo inestimável auxílio técnico-científico

**A Patrick J. Spencer,
pela constante colaboração e amizade,**

**A Almir R.Ferreira e Roberto Márcio M.Fraga,
pelo apoio na parte fotográfica,**

**A Divisão de Medicina (TBM), em especial à: Maria Tereza C.P.Ribela,
Rosângela R.Arkaten e João E.Oliveira,
pela presteza e interesse em nos ajudar,**

**Aos funcionários da CNEN/SP, especialmente Ivani de Miranda e Rute
M.Batista, secretárias, Eunice O.Lima e Maria W.Aguiar, auxiliares de
laboratório e Manoel Calixto L.Silva e Cicero F.Santos, auxiliares de
biotério,
pelo carinho e ajuda**

**Ao CNPq,
pelo financiamento desta dissertação sob a forma de bolsa**

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CROTOXINA NATIVA E IRRADIADA

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

NANCI DO NASCIMENTO

RESUMO

A radiação ionizante é capaz de detoxificar venenos, dentre eles os ofídicos, sem alterar significativamente suas propriedades antigênicas e imunogênicas. Para elucidar este processo, efetuamos um estudo comparativo entre a crotoxina, principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativa e após irradiação com 2000Gy, abordando estudos bioquímicos e farmacológicos. A crotoxina foi isolada a partir de veneno bruto, por exclusão molecular e precipitação no pI e irradiada de forma homogênea em solução acidificada. Através de imunodifusão, eletroforese e cromatografia de exclusão molecular, foi possível demonstrar a integridade da molécula após irradiação, com pequena formação de agregados de peso molecular maior, com manutenção de sua capacidade antigênica. Os anticorpos induzidos pela toxina irradiada apresentaram título semelhante aos induzidos pela nativa, porém são mais eficientes na proteção.

A toxicidade da crotoxina foi diminuída em 15 vezes pelo processo de irradiação. A biodistribuição da crotoxina nativa ou irradiada mostrou um padrão geral semelhante, com excreção basicamente renal. A crotoxina nativa é retida precocemente nos rins, ao contrário da irradiada. Ocorre concentração mais tardia (2-3hs) em órgãos ricos em sistema fagocítico mononuclear (fígado e baço) e em órgãos ricos em terminações nervosas (músculo e cérebro).

COMPARATIVE STUDY OF NATIVE AND IRRADIATED CROTOXIN. BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS

NANCI DO NASCIMENTO

SUMMARY

Ionizing radiation is able to detoxify several venoms, including snake venom, without affecting significantly their antigenic and immunogenic properties. In order to elucidate this phenomena, we conceived a comparative biochemical and pharmacological study between native and gamma irradiated(2000Gy) crotoxin, main toxin of south american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxin was isolated and purified from crude venom by molecular exclusion chromatography, pI precipitation and then irradiated. Immunodiffusion, electrophoresis and gel filtration showed that the molecular integrity was preserved after irradiation with some higher molecular weight aggregate formation and maintenance of its antigenic capacity. The antibodies induced by irradiated toxin had a similar titer to the antibodies induced by native crotoxin; however with higher protective effects in mice. Crotoxin toxicity became 15 times lower after irradiation, as determined by LD₅₀ in mice. Native and irradiated crotoxin biodistribution occurred with a similar general pattern, with renal elimination. In contrast to irradiated crotoxin, the native crotoxin is initially retained in kidneys. A later concentration (2-3hs) occurs in phagocytic-mononuclear cells rich organs (liver and spleen) and neural junctions rich organs (muscle and brain).

"Scavengers" de OH

O radical hidroxila (OH^\cdot) é considerado como o mais prejudicial à macromolécula e células.

Radicais sulfidrílica (RSH) que são doadores de hidrogênio, adicionados, ainda que em baixa concentração, a uma solução contendo radicais hidroxila, sequestram prontamente estes radicais indicando portanto que, nessas baixas concentrações, podem reparar eficientemente moléculas danificadas através da doação de um átomo de hidrogênio.

Alcôois como metanol, isopropanol, e álcool butílico são comumente usados para sequestrar radicais hidroxila²⁴.

"Scavengers" de elétrons solvatados (e^-_{aq})

Para esse fim, temos o oxigênio que interage com elétrons solvatados em alta proporção. No entanto, outros compostos como o nitrato podem competir eficazmente com o oxigênio por elétrons solvatados.

A irradiação de proteínas tanto no estado seco quanto em solução aquosa tem sido estudada por causar mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias, secundárias e terciárias das proteínas^{19,78}.

Estas mudanças estão relacionadas com perda da atividade biológica além de possíveis alterações nas propriedades imunológicas após a irradiação.

Sabe-se que a energia absorvida da radiação ionizante pode inativar materiais biológicos por dois caminhos^{18,19,32}.

-Efeito direto: observado quando a ionização é produzida na própria molécula quando um componente é irradiado.

-Efeito indireto: resultado das reações entre moléculas estudadas e os produtos de interação da radiação com a água ou outros solventes.

ÍNDICE

	Página
I-Introdução	1
II-Objetivos	10
III-Materiais e Métodos	11
1-Materiais	11
2-Métodos	12
2.1 - Obtenção de crotoxina pura a partir de veneno total de <i>C.d.terrificus</i>	12
2.2 - Dosagem de Proteínas	14
2.3 - Irradiação da crotoxina	15
2.4 - Cromatografia de exclusão molecular comparativa entre crotoxina nativa e irradiada	15
2.5 - Imunodifusão	16
2.6 - Análise bioquímica da crotoxina	17
2.6.1- Eletroforese	17
2.6.2- Espectro de Absorção	18
2.6.3- Análise de aminoácidos	18
2.7 - Determinação da atividade tóxica	18
2.8 - Imunogenicidade	19
2.9 - Obtenção de crotoxina marcada com ^{125}I	21
2.10- Precipitação de complexo antígeno-anticorpo com polietileno glicol	22
2.11- Biodistribuição de crotoxina	23
IV-Resultados	25
1- Isolamento, purificação e irradiação da crotoxina	27
2- Testes analíticos de crotoxina	28
2.1 -Crotoxina nativa e irradiada comparadas pela cromatografia de exclusão molecular	28
2.2 -Imunodifusão	29
2.3 -Eletroforese	29
2.4 -Espectro de absorção	32
2.5 -Determinação da atividade tóxica	32
2.6 -Imunogenicidade	34
2.7 -Obtenção de crotoxina marcada com ^{125}I	34
2.8 -Precipitação com PEG	38
2.9 -Análise de aminoácidos	38
2.10-Biodistribuição das crotoxina	40
V-Discussão	44
1- Aspectos bioquímicos	44
2- Aspectos imunológicos	47
3- Aspectos farmacológicos	48
VI-Conclusões	50
VII - Referências Bibliográficas	51

I - INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos têm sido um problema relevante em nosso meio, estimando-se a existência de 70000 casos anualmente. Cerca de 13% destes acidentes são devidos a *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel brasileira⁷², com alto grau de letalidade caso não seja instituído, a tempo, tratamento soroterápico adequado.

A obtenção de antissoros ofídicos se dá principalmente através da imunização de cavalos, os quais são fortemente agredidos pela alta toxicidade dos imunógenos. Com isto tornou-se necessário desenvolver-se técnicas de produção de antissoros com maior rendimento e menor toxicidade para estes animais.

Vários trabalhos têm sido realizados com toxinas de uma maneira geral, no sentido de se obter um produto menos tóxico mas que preserve, no entanto, suas propriedades imunogênicas e antigênicas originais. Nesse sentido, podemos citar Tejasen e cols.⁸³, que usaram a radiação ultravioleta para detoxificar o veneno de *Aglastrodon piscivorus*, que teve suas atividades fosfolipásica, proteínásica e fosfodiesterásica inativadas e capacidade imunogênica preservada. Já, Baride e cols⁷ usaram a radiação gama ou formalina para tratar venenos de *Naja naja*, *Bungarus cheruleus*, *Echis carinatus* e *Vipera russeli* e verificaram mudanças nos parâmetros bioquímicos, com aparecimento de polímeros, mas com preservação da capacidade imunogênica de cada um. A radiação gama também foi utilizada por Puranananda⁶⁹, Salafranca⁷⁵, Kankonkar e cols⁵⁰ e Herrera e cols⁴⁵ que mostraram a detoxificação de venenos de várias espécies de serpentes, com manutenção das propriedades imunogênicas originais. Heneine e cols⁴⁴, Daniel e cols²⁵ e Heneine e cols⁴³ têm estudado a detoxificação de venenos através da iodação.

Outros agentes, como o formaldeído²², carboximetil-celulose^{31,59}, irradiação com raios X²⁸, ultravioleta⁸³, foto-oxidação⁵¹, glutaraldeído³⁵, tanino⁶⁵, calor⁷¹ inibidores de centro ativo⁴⁶ e outros reagentes⁸⁴ foram utilizados na detoxificação de venenos, com resultados variáveis.

Dentre estes métodos, a radiação ionizante tem se mostrado uma ótima ferramenta na detoxificação de venenos, com preservação das propriedades imunogênicas e antigênicas e sem a adição de novas substâncias que poderiam vir a funcionar como imunógenos no processo.^{7,23,34,40,61,62,73,81}

Radiação ionizante

A passagem de uma partícula energética ou mesmo um fóton causa projeção de um elétron de um átomo, resultando na criação de um par de íons positivo e negativo. Este fenômeno chamado ionização é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para tecidos biológicos.

Devido a sua predominância na maioria dos tecidos biológicos, a água é a molécula da qual mais frequentemente o elétron é expelido.

Em adição à ionização ocorre a excitação onde uma fração significativa de partículas energéticas ou radiação eletromagnética é dissipada por excitação de elétrons. Neste caso, um elétron externo de um átomo alvo absorve energia suficiente para atingir um estado energético mais elevado mas não é expelido³².

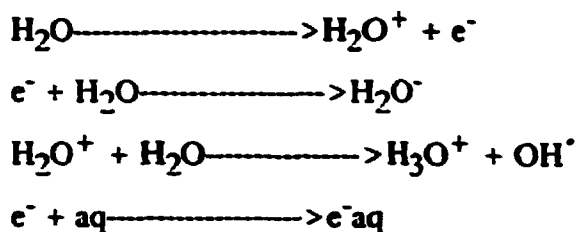
Os radicais livres, dentre os produtos oriundos do processo de absorção de energia, têm importância particular. Um radical livre é um átomo com um único elétron do orbital desemparelhado, tem vida curta e alta probabilidade de reagir com outro átomo, quer combinando seu elétron desemparelhado com um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

Cada uma dessas interações podem gerar íons adicionais ou radicais livres e a maioria dos danos da radiação às moléculas orgânicas está associada com tais cadeias de interações de radicais livres secundários^{18,19}.

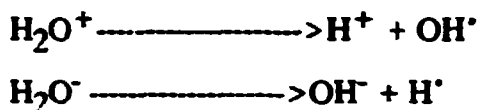
Dado que a água é o constituinte mais abundante do material biológico é importante considerar as espécies produzidas pela excitação e ionização dela mesma além da reação de espécies com moléculas alvo de importância biológica.

Com a água a excitação é menos importante que a ionização. A energia da excitação pode simplesmente ser convertida em calor ou no caso de levar a mudanças químicas, isto consiste em grande parte na formação de radicais livres e espécies moleculares como aquelas produzidas pela ionização^{19,78}.

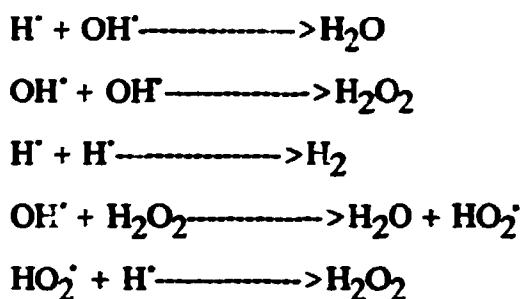
A ionização ocorre dentro de pico-segundos pela formação de radicais hidroxilas livres e elétrons hidratados⁷⁸:



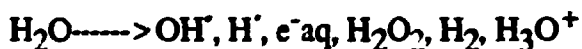
Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis, podendo dissociar-se em:



Os radicais livres H^\cdot e OH^\cdot formados apresentam-se altamente reativos como:



A irradiação da água pura ou soluções diluídas gera espécies moleculares e radicais livres, as quais possuem alto poder de reação com o soluto:



Esses radicais livres, extremamente danosos às macromoléculas, podem entretanto ser capturados por substâncias denominadas "scavengers" que conseguem sequestrá-los do meio onde se encontram, protegendo assim as macromoléculas.

Dentre as espécies citadas, o OH^\cdot e o e^-_{aq} têm maior importância por possuírem alto rendimento quando se utiliza a radiação gama de CO-60 ^{18,19,24}.

Quando um composto é irradiado em solução, o efeito indireto se associa ao direto. Exemplificando, enzimas puras em soluções muito diluídas são inativadas por uma menor exposição aos raios gama do que a necessária para inativar preparações secas ou contendo outros constituintes⁷⁹.

No efeito indireto, temos uma maior sensibilidade das soluções diluídas, uma maior sensibilidade na presença de oxigênio assim como um efeito protetor de substâncias orgânicas presentes na solução⁵⁴.

Considerando-se estes fatos, é compreensível que o efeito final da irradiação de proteínas seja diferente quantitativa e qualitativamente de acordo com as condições empregadas. Assim, ao se submeter uma amostra aos efeitos da radiação gama, alguns parâmetros devem ser analisados:

-condições físicas: fonte, dose, taxa de dose, temperatura, amostras líquidas ou cristalizadas.

-condições químicas: tipo de solvente, concentração da amostra, presença de gases e presença de radiomodificadores..

-características biológicas: toxicidade, antigenicidade e conteúdo enzimático.

Quando se tratar de amostra não purificada, deve-se levar em conta a proteção mútua dos componentes presentes⁷⁹. Devido às propriedades alostéricas das enzimas e à proteção ou sensibilização dos efeitos devido aos substratos ou ligantes presentes, uma modificação seletiva do efeito da radiação sobre as várias frações dos venenos de serpentes poderia ser obtida pela escolha dos componentes adicionados.

Assim, a ação da radiação em solução pode ser modificada por vários fatores como; pH do meio, presença de outras substâncias, concentração, presença de oxigênio, temperatura de irradiação e outros, os quais podem exercer uma radioproteção ou radiosensibilização das macromoléculas que constituem o soluto⁷⁸.

A análise química da irradiação de proteínas tem revelado dano para os aminoácidos na cadeia lateral com produção de novos grupos (quebra das ligações C-N nos aminoácidos; quebra de ligações S-S com formação de grupos SH; ou, ao contrário, oxidação dos grupos SH para ligações S-S).

Há evidência também de quebra nas ligações peptídicas e formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares.

O grande problema da química da radiação de proteínas é a relação entre mudanças químicas e conformacionais e perda da atividade biológica. Esta última tem sido atribuída às alterações químicas de alguns aminoácidos no seu centro ativo, à quebra de pontes dissulfeto, mudanças conformacionais devido a distúrbios das pontes de hidrogênio e às ligações cruzadas ou cisões na cadeia polipeptídica^{18,19,78}.

A radiação por promover o desdobramento das moléculas de proteínas as faz mais sensíveis a outros fatores físico-químicos. Assim é de se esperar que tal fenômeno possa auxiliar no preparo de toxóides e vacinas naqueles casos onde não se conseguem bons resultados por outros métodos⁷. Além do mais, do ponto de vista radioquímico, a irradiação de proteínas em solução, na presença de alguns componentes reativos, poderia levar a uma inativação seletiva das propriedades biológicas.

A radiação ionizante pode também contribuir para a formação de ligações covalentes intermoleculares levando ao aparecimento de dímeros, trímeros e outros em solução, favorecendo o surgimento de precipitado^{18,19}.

Convém ainda considerar que as várias funções das proteínas têm diferentes radiosensibilidades. Assim, propriedades antigênicas são mais radiorresistentes do que qualquer função biológica da proteína.

Uma vez que os venenos são ricos em proteínas, vislumbrou-se a possibilidade do uso da irradiação ionizante para induzir alterações capazes de detoxificar o veneno, com manutenção das suas propriedades imunogênicas e antigênicas. Conforme trabalhos já citados, isto é possível, a partir da escolha da dose ideal de radiação e concentração da amostra de veneno.

A cascavel sul-americana subordina-se ao gênero *Crotalus* e à espécie *durissus*. Atualmente, são reconhecidas várias subespécies de *C.durissus* na América do Sul, entre elas, a *C.d.terrificus*⁸⁸.

O veneno desta serpente caracteriza-se por apresentar alta toxicidade, causar paralisia flácida, produzir hemólise indireta *in vitro* e *in vivo*⁸⁸, ser miotóxico^{3,4,5,16,52}, miolítico⁶, rabdomiolítico^{5,57} e causar morte por paralisia respiratória⁸⁷; no entanto, a maior parte dos óbitos ocorre devido a insuficiência renal aguda⁸⁸.

Este veneno encerra vários componentes farmacologicamente ativos, como a crotoxina, crotamina, convulxina, giroxina e delta toxina⁸⁶.

A crotamina³⁰, uma toxina polipeptídica básica (P.M.4880), é encontrada apenas na peçonha de cascaveis de certas regiões^{9,77} e tem atividade miotóxica⁸⁸.

A convulxina apresenta elevado peso molecular e produz convulsões, perturbações respiratórias e circulatórias, além de lisar e agregar plaquetas^{67,68,86}.

A giroxina, com peso molecular estimado em 65000, apresenta como efeito característico movimentos de rotação observados em camundongos⁸.

A delta-toxina, uma toxina pouco estudada e ainda não isolada, é pouco conhecida do ponto de vista farmacológico, embora uma ação hemoconcentrante tenha sido identificada, por alteração na permeabilidade vascular⁸⁸.

A crotoxina é o componente protéico responsável pela elevada toxicidade do veneno, tendo sido isolada pela primeira vez em estado cristalino por Slotta e Fraenkel-Conrat em 1938⁸⁰, que a consideraram como uma proteína homogênea.

Mais tarde, em 1956, Fraenkel Conrat²⁹, tratando a crotoxina com fluoro-dinitrobenzeno, mostrou que essa proteína é composta por duas subunidades. Estudos subsequentes classificaram essas subunidades, como sendo uma fortemente básica, com atividade fosfolipásica denominada fosfolipase A₂ e outra, de caráter ácido e atividade enzimática desconhecida, embora determinante da ação tóxica do veneno de *Crotalus* especificamente^{74,10} denominada crotapotina⁴¹.

O complexo crotoxina, formado pela associação não covalente das subunidades ácida e básica na proporção molar 1:1^{63,73}, apresenta peso molecular de 24000 daltons²⁷.

A toxicidade, tanto muscular como neural, da fosfolipase de *Crotalus* é potencializada pela crotapotina enquanto que *in vitro* a atividade fosfolipásica da enzima é reduzida^{17,74}. A crotoxina tem atividade enzimática de fosfolipase A₂^{37,41,74,86} e exibe também atividade hemolítica indireta⁴¹.

O complexo crotoxina atua ao nível da junção neuromuscular, de forma pós sináptica^{12,38,86} e pré sináptica⁸⁵, bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos quer combinando-se com os receptores da placa terminal das junções neuromusculares pós-sinápticas, estabilizando o receptor de acetil colina em um estado conformacional inativo¹², quer inibindo a liberação do neurotransmissor das junções neuromusculares pré-sinápticas⁸⁵.

Marlas e Bon⁵⁸ mostraram que a atividade fosfolipásica da crotoxina é necessária para o desenvolvimento de sua ação bloqueadora pós sináptica.

As duas subunidades da crotoxina são fortemente associadas, no entanto, na interação com membranas, a crotoxina se dissocia nas subunidades liberando a crotapotina em solução¹².

A fosfolipase tem alta afinidade por fosfolípeos carregados negativamente⁷⁰ e se liga de maneira inespecífica à membranas biológicas¹², possuindo baixa toxicidade quando isolada^{36,37}.

A crotapotina não interage com vesículas fosfolipídicas⁷⁰ ou membranas biológicas¹², é atóxica e não apresenta ação farmacológica isolada^{36,37}, entretanto a crotapotina confere a especificidade da ligação da fosfolipase, prevenindo ligações de baixa afinidade^{12,49}, ou seja, ligações que não sejam a fosfolípeos carregados negativamente⁷⁰ e membranas pós-sinápticas.

A crotapotina, ao combinar-se com a fosfolipase A₂, aumenta a eficiência farmacológica e em particular a potencia letal desta enzima^{11,63,73,41}.

Assim, a crotapotina previne a adsorção inespecífica da fosfolipase sobre membranas e a direciona para seu alvo farmacológico, que pode consistir, pelo menos em parte, de fosfolípeos carregados negativamente^{13,14}.

A fosfolipase A₂ tem baixa toxicidade e age na junção neuromuscular como a crotoxina, embora sejam necessárias doses maiores para a obtenção de efeito semelhante^{13,27,47}.

Foi observada a presença de muitas variantes de ambas as subunidades, diferindo em suas propriedades cromatográficas ou eletroforéticas, o que justifica a identificação de várias isoformas de crotoxina²⁷.

Recentemente, Murata e cols⁶², estudando a detoxificação do veneno total de *C. d. terrificus*, em solução, através da irradiação com raios gama em várias doses, concluíram que a dose de 2000 Gy é a mais eficaz na detoxificação do veneno conservando íntegras as propriedades antigênicas e imunogênicas.

Assim, sendo a crotoxina o componente mais tóxico e prevalente desse veneno, pareceu-nos a candidata ideal para um estudo elucidativo sobre a ação dos raios gama na detoxificação.

II - OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo determinar o comportamento da crotoxina submetida ou não aos efeitos da radiação ionizante, comparando suas propriedades bioquímicas e farmacológicas, enfatizando os seguintes aspectos:

- Comportamento cromatográfico da toxina irradiada**
- Efeitos da radiação nas atividades antigênicas e imunogênicas.**
- Alterações químicas ocorridas devido à irradiação**
- Estudo da atividade biológica da toxina irradiada**
- Biodistribuição comparativa entre crotoxina nativa e irradiada.**

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - MATERIAIS

1.1 - O veneno de *C.d.terrificus* e o soro anticrotálico ampolado foram doados pelo Instituto Butantan de São Paulo. O veneno cristalizado foi conservado sêco a -20°C . O soro, cuja capacidade de neutralização era de 1,5 mg de veneno crotálico por mililitro, também foi mantido a -20°C .

1.2 - Os animais de experimentação eram procedentes do Biotério do Depto. de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN, mantidos em gaiolas com maravalha de pinho, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

1.3 - Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de qualidade pró análise e a água utilizada era previamente bidestilada em destilador de quartzo.

2 - MÉTODOS

2.1 - Obtenção de crotoxina pura a partir de veneno total de *C.d.terrificus*.

2.1.1 - Isolamento de frações do veneno total

A metodologia empregada para isolar a crotoxina do veneno total foi a cromatografia de exclusão molecular num sistema tampão não denaturante, como a empregada por Nakazone e cols⁶³ e Rogero⁷³, com algumas modificações.

A - Reagentes.

a- Gel Sephadex^R G-75 fino (partículas de 40 a 120µm)

b- Solução de ácido acético 0,1M pH 3,0

c- Marcadores de peso molecular: Azul de Dextrana (P.M. 2000000), 2mg/ml, e Azul de Bromofenol (P.M.670), 0,2mg/ml.

B - Procedimento

A cada cromatografia foram dissolvidos 150 mg do veneno total cristalizado em 4 ml de ác. acético 0,1M pH 3,0 e a seguir a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos (10000g), em uma centrífuga refrigerada Sorvall RC2B. Reservou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 2 ml de ác.acético 0,1M pH 3,0 e centrifugado nas mesmas condições. Os dois sobrenadantes, reunidos e homogeneizados, foram submetidos a cromatografia em gel de Sephadex^R G-75.²⁷ O gel foi previamente hidratado e entumescido em ác.acético 0,1M pH3,0 por 24 hs, sendo a seguir empacotado em uma coluna de 100x2,8 cm, atingindo uma altura de 80 cm e mantendo-se um fluxo de 12ml/hora de ác.acético 0,1M pH3,0. A amostra, contendo crotoxina ou marcadores, num volume máximo de 4 ml, foi aplicada, sendo colhidas frações de 2,2ml em coletor automático de frações tipo LKB Ultrorac 7000, em câmara refrigerada a 4°C. Uma eluição inicial dos marcadores permitiu determinar o volume de exclusão e o volume total da coluna. Para crotoxina, a absorvância a 280 nm das frações foi determinada em espectrofotômetro Zeiss PMQ-II, em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso

óptico. O conteúdo protéico das frações também foi determinado por métodos colorimétricos¹⁵.

Os valores obtidos através da cromatografia foram plotados e as frações referentes ao pico da crotoxina, representando uma distribuição homogênea, foram reunidas, sendo a seguir liofilizadas.

2.1.2 - Cromatografia de exclusão molecular das frações correspondentes a crotoxina obtidas em 2.1.1

A- Reagentes

a- Gel Sephadex^R G-100(partículas de 40 a 120µm)

b- Tampão formiato de amônio 0,1M pH 3,0

c- Marcadores, já descritos em 2.1.1

B- Procedimento

O gel, previamente hidratado e entumescido em tampão formiato por 24 hs, foi empacotado em coluna de vidro de 80 x 1,5cm até atingir 60 cm, com fluxo de tampão formiato mantido constante em 12 ml/hora, em câmara refrigerada a 4°C. Foram eluídos padrões para determinação do volume de exclusão e volume total da coluna.

A amostra, contendo crotoxina liofilizada, foi diluída para uma concentração de 40 mg/ml de proteína, num volume máximo de 1 ml. Após a aplicação, foram colhidas frações de 1,1 ml, sendo determinada a absorvância a 280nm. As frações com distribuição homogênea foram reunidas e liofilizadas

2.1.3. - Precipitação da crotoxina no ponto isoelétrico(pI = 4,7)⁴²

A- Reagentes

a- Solução de ácido fórmico 1M

b- Hidróxido de Amônio 0,1M

c- Solução salina acidificada a pH3,0(NaCl 0,85%, HCl 0,001M)

B- Procedimento

Cêrca de 30 mg de crotoxina recromatografada foram dissolvidos em 4,0 ml de água bidestilada. A seguir esta solução foi levada a pH 3,0 em um potenciômetro Incibrás, adicionando-se ácido fórmico.

A mistura foi titulada com hidróxido de amônio até atingir o pI da crotoxina (pH4,7), sendo a seguir, centrifugada a 12000rpm por 10 minutos(15000g). O precipitado foi ressuspenso em salina acidificada sendo conservado em freezer a -20°C.

2.2 - Dosagem de Proteínas

Para se padronizar as concentrações protéicas nos testes a serem realizados, foi determinado o conteúdo protéico da crotoxina purificada e do veneno total, pelo método de Bradford¹⁵. A reação baseia-se na capacidade das proteínas interferir com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional da cor, detectável a 595nm.

A- Reagentes

- a- Albumina bovina
- b- Coomassie Brilliant Blue G-250(CBB)
- c- Ácido fosfórico 85%
- d- Etanol

B- Procedimento

O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de CBB em 50 ml de etanol, seguido da adição de 100 ml de ácido fosfórico 85%, após o que a mistura foi levada ao volume final de 1000 ml, com água bidestilada.

Para a reação, foram adicionados 3,0 ml de reagente a uma amostra contendo 100 ul de proteína dissolvida em salina, em duplicata. Após um tempo mínimo de 2 minutos à temperatura ambiente, determinou-se a densidade óptica a 595 nm, comparando-se o valor obtido com uma curva padrão obtida, utilizando-se albumina bovina em diluições seriadas a partir de 1 mg/ml. Para controle, utilizou-se apenas salina e reagente.

Os dados obtidos, utilizando-se soluções de albumina, permitiram a obtenção de uma função linear do tipo

$$Y = Ax + B$$

onde Y é a concentração de proteína; x, a absorvância obtida; A, o coeficiente angular da reta e B, a intersecção ou constante inicial da reta. Os valores apresentaram alta correlação ($r^2 > 0.98$)

2.3 - Irradiação da crotoxina

2.3.1- Preparação

Cerca de 10 mg de crotoxina foram dissolvidos em 5,0 ml de salina acidificada descrita anteriormente. Esta mistura foi submetida à filtração em filtro de nitrocelulose (poro de 0,22u) e a quantidade final de proteína, determinada colorimetricamente.

2.3.2 - Irradiação

O produto da preparação anterior(2.3.1), em uma concentração de 2 mg/ml, foi irradiado de forma homogênea com 2000 Gy em frasco de vidro, utilizando-se raios gama procedentes de uma fonte de Cobalto 60 Gammacell 220(Atomic Energy of Canada Ltd). A irradiação ocorreu na presença de O₂, em temperatura ambiente, com uma taxa de dose de $8,51 \times 10^2$ Gy/h.

2.4 - Cromatografia de exclusão molecular comparativa entre crotoxina nativa e irradiada.

A- Reagentes

a- Gel Sephadex^R G-75(partículas de 40 a 120um)

b- Solução de ácido acético 0,1 M pH3,0

c- Padrões, já descritos em 2.1.1

B- Procedimento

Cerca de 5mg de crotoxina nativa ou irradiada foram dissolvidos em 2 ml de ácido acético 0,1M pH 3,0, filtrados em membrana de 0,22u e submetidos a cromatografia, segundo o processo descrito em 2.1.1, exceto que o comprimento de onda utilizado na detecção foi 230nm, devido a menor quantidade de proteína utilizada.

2.5 - Imunodifusão pelo método de Ouchterlony ⁶⁶

Esse método foi descrito há 30 anos, sendo amplamente utilizado, pois permite a comparação simultânea de muitos sistemas antígeno- anticorpo, num mesmo teste.

Em nosso modelo, a imunodifusão foi utilizada para observar qualitativamente a capacidade antigênica do veneno total e sua fração principal submetida ou não aos efeitos da radiação ionizante.

A- Reagentes

a- Ágar-ágar

b- Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0

c- Soro anticrotálico

d- Salina(NaCl 0,15M)

e- Negro de amido 0,4% em ác.acético 10%

B- Procedimento

Inicialmente, lâminas de microscopia foram recobertas com 1 ml de ágar-ágar 2% em água e secas em estufa. Após a secagem, 3 ml de ágar-ágar 2% em tampão fosfato foram distribuídos sobre as lâminas previamente revestidas, sendo mantidas a 4°C por 24 h. Foram feitos então 5 orifícios no gel, de 2mm de diâmetro, sendo o primeiro central e os demais dispostos isometricamente a uma distância de 1 cm.

Os antígenos a serem estudados, na concentração de 1 mg/ml foram colocados nos orifícios periféricos, sendo colocado soro anticrotálico no orifício central.

As lâminas ficaram à temperatura ambiente por 24 h em câmara úmida. Após esse tempo, elas foram lavadas pelo menos 15 vezes com salina e a seguir 15 vezes com água bidestilada, secas e coradas com solução de Negro de Amido por 10 minutos.

Após descoloração com ácido acético 5%, as bandas contendo os complexos imunes puderam ser evidenciadas e as lâminas estocadas depois de secas.

2.6 - Análise bioquímica da crotoxina

2.6.1 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida em condições denaturantes(EGPA-SDS)⁵³.

A EGPA-SDS foi utilizada para detectar, através do peso molecular, frações do veneno, seu grau de pureza, bem como alterações nestes parâmetros causadas pela irradiação.

A- Reagentes

As concentrações finais dos tampões utilizados nas várias fases do processo foram:

Tampão de amostra: Tris/HCl pH 6,8, 0,0625M, Uréia 2M, SDS 1%, 2-mercapto-etanol 1%

Gel de empilhamento: Tris/HCl 0,125 M pH 6,8

Gel de resolução: Tris/HCl 0,375 M pH 8,8

Tampão de corrida: Tris 0,025 M Glicina 0,192 M pH 8,3

B- Procedimento

A concentração relativa de acrilamida-bisacrilamida foi mantida em 30:0,8 sendo de 15% a concentração final de acrilamida no gel de resolução, utilizando-se 5% para gel de empilhamento . Em cada gel, foram incluídos em poço isolado, marcadores padrões de peso molecular conhecido, descritos na tabela 1.

TABELA 1

Proteína	Peso Molecular(daltons)
Albumina bovina	66000
Ovalbumina	45000
Gliceraldeído desidrogenase	36000
Tripsinogênio	29000
Inibidor da tripsina de soja	20100
Anidrase carbônica	20000
alfa-lactalbumina	14200

As amostras e os marcadores foram denaturados em câmpão de amostra a 100°C, em banho maria, por 2-5 minutos antes da aplicação de 50 ul em cada poço isolado. Após a eletroforese (100 V por 5 hs), o gel de resoição foi fixado em Metanol-Acético-Água (50:10:40) por pelo menos 12 h., lavado e corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Após a coloração, o gel foi sêco entre folhas de celofane comercial.

2.6.2 - Espectro de absorção na região do ultravioleta.

Amostras de frações protéicas, na concentração de 0,5mg por ml, foram analisadas no intervalo de 230 a 350 nm, sendo a absorvância determinada em um espectrofotômetro de duplo feixe Cary 118C, com registro automático, nos vários comprimentos de onda. A leitura foi obtida contra uma solução de NaCl 0,15M pH 3,0, que foi utilizada como solvente.

2.6.3 - Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos das crotoxinas nativa e irradiada foi gentilmente executada pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Prêto, chefiado pelo Prof.Dr.L.Green, seguindo as técnicas usuais para execução do método (hidrólise com LiOH e HCl).

2.7 - Determinação da atividade tóxica

A determinação da toxicidade das amostras de crotoxina nativa e irradiada foi feita em camundongos, inoculados por via intraperitoneal, utilizando-se 6 animais por dose. Passadas 24 horas foi feito o cálculo da dose letal 50% pelo método de Spearman-Kärber⁹⁰.

A- Procedimento

Para êste experimento foram seleccionados, pelo pêso (18-22g), 72 camundongos albinos machos, divididos em grupos de 06 animais, que foram inoculados por via intraperitoneal, com 200 ul da crotoxina nativa ou irradiada. O grupo controle recebeu solução fisiológica (200 ul) pela mesma via de inoculação.

As mortes e a sobrevida foram anotadas 24 hs após o inóculo. As concentrações de veneno inoculadas por animal estão descritas na tabela 2.

Tabela 2

Concentração de crotoxina nativa ou irradiada inoculada por animal

Grupo	Dose de crotoxina nativa	Grupo	Dose de crotoxina irradiada
1	4,00 ug	7	40,00 ug
2	3,08 ug	8	30,80 ug
3	2,37 ug	9	23,70 ug
4	1,82 ug	10	18,20 ug
5	1,40 ug	11	14,00 ug
6	1,07 ug	12	10,70 ug

Fator de diluição 1:1,3

2.8 Imunogenicidade das crotoxinas nativa e irradiada em camundongos.

2.8.1 - Imunização dos animais

Os camundongos utilizados eram machos, pesavam 35g em média e foram divididos em 3 grupos de 12 animais, sendo que um grupo recebeu apenas adjuvante, enquanto os demais receberam crotoxina nativa ou crotoxina irradiada, em doses proporcionais da DL_{50} (85ug/kg).

A via de inoculação utilizada nesse experimento foi a intracutânea.

O esquema de imunização está descrito a seguir na tabela 3

Tabela 3

Esquema de imunização para determinação de imunogenicidade de crotoxina purificada.

Época	Tipo de excipiente	Quantidade inoculada
1 ^a .semana	Freund Completo	2,0 DL50
2 ^a .semana	Freund incompleto	2,0 DL50
4 ^a .semana	Hidróxido de alumínio	2,0 DL50
6 ^a .semana	PBS*	2,0 DL50
7 ^a .semana	PBS	5,0 DL50(Reforço)

* Solução salina tamponada com fosfato de sódio pH7,2

Na 1^a semana, os animais foram desafiados com 10 DL₅₀ de crotoxina nativa, pela via intraperitoneal, sendo observada a mortalidade por 24hs.

2.8.2 - Ensaio imunoenzimático(Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA)³⁹

A- Reagentes

- a- Placas de microtitulação Hemobag, de 96 poços
- b- Tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6
- c- Solução salina, contendo 0.05% de Tween 20^R
- d- Tampão fosfato de sódio pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20^R
- e- Soro anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase
- f- PBS contendo 1% de albumina bovina e 0,05% de Tween 20^R
- g- orto fenilenediamina
- h- Água oxigenada
- i- Tampão citrato/fosfato 0,15M pH 5,0
- j- Ácido sulfúrico 4N

B-Procedimento

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de detectar no soro de camundongos possíveis anticorpos formados contra crotoxina purificada nativa ou irradiada de acordo com o grupo analisado. Para tanto, foram sensibilizadas, por 12 hs a 4°C, placas plásticas de 96 poços com 100 ul de uma solução contendo 1ug/ml de crotoxina nativa ou veneno total, ambos dissolvidos em tampão carbonato de sódio 0,05M pH9,6. A placa foi lavada com solução salina contendo Tween 20 0,05%, sendo aplicados, nos poços, 100 ul de soro de camundongos previamente imunizados, diluídos a partir de 1/200 em tampão fosfato de sódio pH7,2, com Tween 20 0,05%.

Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e iniciou-se a revelação com adição de 100ul de soro anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1/1000 em PBS contendo albumina bovina 1% e Tween 20 0,05%. Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e a reação revelada pela adição de 100ul de solução de substrato, contendo 0,02% de orto-fenilenodiamina, 0,0015% de água oxigenada em tampão citrato/fosfato 0,15M pH 5,0. A reação prosseguiu por 60 minutos à temperatura ambiente e foi então interrompida com a adição de 50 ul de ácido sulfúrico 4N.

A leitura de cada poço foi feita em leitor automático de microplaca, utilizando-se filtro de comprimento de onda de 492nm.

2.9 - Obtenção de crotoxina marcada, por iodação com ¹²⁵I.

2.9.1- Marcação da Crotoxina com ¹²⁵I.

O método de marcação empregado foi o descrito por Hunter e Greenwood⁴⁸, denominado também de Método Clássico da Cloramina T.

A Cloramina T promove oxidação do iodo que reage com o anel aromático (Tirosina) numa reação de substituição que envolve o ataque eletrolítico desse anel aromático do aminoácido. O pH ótimo de iodação fica em torno de 7,5.

A- Reagentes

- Tampão fosfato 0,5M pH7,4
- Amostra dissolvida em Tampão Fosfato Salina (PBS)
 ^{125}I
- Cloramina T dissolvida em tampão fosfato 0,05M pH7,4
- Metabissulfito de sódio em tampão fosfato 0,05M pH7,4
- Iodeto de potássio dissolvido em tampão fosfato contendo 1mg/ml de albumina bovina.
- Azul de dextrana dissolvido em tampão fosfato com albumina

B- Procedimento

Em capela, à temperatura ambiente e sob agitação constante, foram misturados 5 ug da crotoxina nativa ou irradiada na concentração de 5ug/10ul de PBS; 800uCi de ^{125}I e 50ug de Cloramina T. Passados 30 segundos, 100ug de Metabissulfito, 200ug de Iodeto de potássio e o Azul de dextrana foram adicionados à mistura.

2.9.2- Purificação do marcado

A purificação das proteínas marcadas com ^{125}I foi feita por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex^R G-100 a 4°C, eluída com tampão fosfato acrescido de albumina, em um fluxo de 12ml/h.

Os tubos resultantes da eluição, contendo 2ml cada um, foram contados no contador de radiação gama Nuclear Chicago para identificação do pico da proteína radioativa.

2.10- Precipitação do Complexo Antígeno-Anticorpo com Polietilenoglicol (PEG)²¹

Esta técnica foi empregada para testar a manutenção da propriedade antigênica da crotoxina após a iodação.

A- Reagentes

- Tampão fosfato 0,5M pH7,4
- Albumina bovina
- Tween 20
- Antissoro crotálico
- Proteínas marcadas(irradiadas ou não)
- PEG 6000
- Soro equino

B- Procedimento

Um volume de 100ul da proteína marcada, irradiada ou não, em uma concentração de 10000cpm foi incubado com 200ul de diferentes diluições de antissoro crotálico (1:5000; 1:10000; 1:50000; 1:200000 e 1:800000).

Para verificar possível precipitação inespecífica foram incubados 200ul de tampão com 100ul do marcado.

Passado o tempo de incubação de 48 horas, determinou-se a radioatividade de cada tubo e em seguida adicionou-se 1ml de uma mistura contendo: PEG/soro equino normal/água destilada.

A amostra foi então homogeneizada para depois ser submetida a uma centrifugação por 20 minutos a 4000rpm. Depois de aspirado o sobrenadante, foi feita a detecção de radioatividade do precipitado.

2.11- Biodistribuição de Crotoxina marcada em órgãos de camundongos.

Camundongos albinos machos, pesando aproximadamente 30g receberam água contendo NaI por uma semana antes de serem iniciados os experimentos. Esses animais divididos em 14 grupos foram inoculados pela veia da cauda com 200000 cpm de crotoxina marcada com ^{125}I , irradiada ou não, contidos em 300ul. Os camundongos foram sacrificados em intervalos de tempo diferentes, sendo retirados sangue e órgãos. Os animais foram mortos por decapitação, com colheita do sangue, seguida de retirada cuidadosa dos seguintes órgãos: baço, fígado, rins, músculo sóleo e cérebro.

A tabela 4 detalha a divisão dos grupos, assim como as amostras inoculadas por animal e o intervalo de tempo entre o inóculo e o sacrifício de cada um.

Tabela 4

Grupo (n ^o animais)	Tipo de crotoxina inoculada	Intervalo entre inóculo e o sacrifício(h)
1(10)	Nativa	0,25
2(10)	Nativa	0,50
3(10)	Nativa	1,00
4(10)	Nativa	2,00
5(10)	Nativa	3,00
6(10)	Nativa	5,00
7(10)	Nativa	24,00
8(07)	Irradiada	0,25
9(07)	Irradiada	0,50
10(07)	Irradiada	1,00
11(07)	Irradiada	2,00
12(07)	Irradiada	3,00
13(07)	Irradiada	5,00
14(07)	Irradiada	24,00

Uma vez retirados, os órgãos foram lavados em solução salina 0,85%, pesados e sua radioatividade determinada em contador de radiação gama Nuclear Chicago. Os valores para cada órgão em cada tempo, foram apresentados como contagem por minuto(cpm)/mg de peso.

O sangue foi centrifugado a 2000 rpm e 100 ul do plasma de cada amostra foram submetidos à contagem.

IV- RESULTADOS

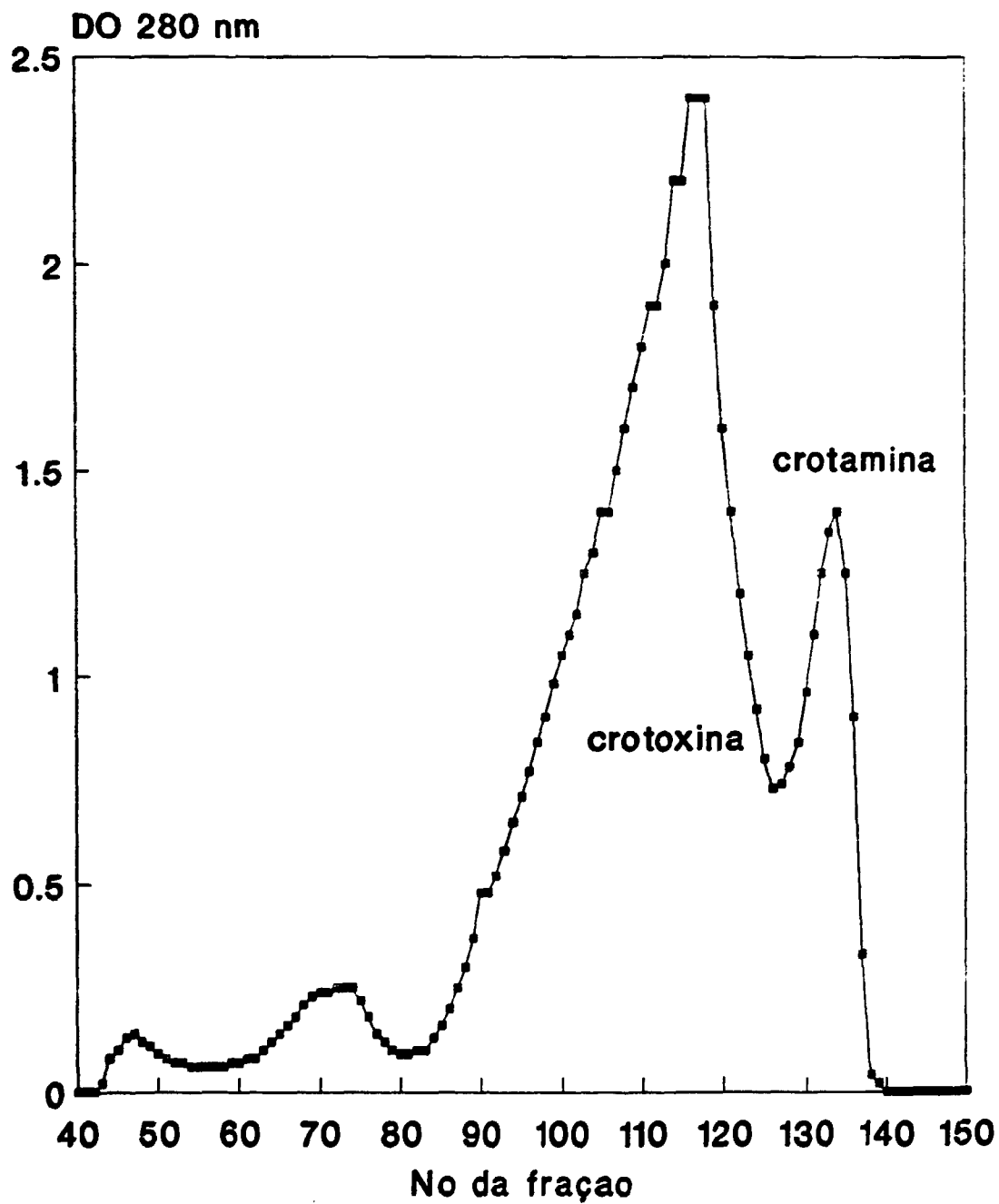
1 - Isolamento, Purificação e Irradiação da Crotoxina

A proteína utilizada em nossos experimentos foi isolada e purificada de acordo com Métodos. Um perfil típico de cromatografia de exclusão molecular em Sephadex^R G-75 de 150 mg de veneno total de *C.d.terrificus* é mostrado na Fig.1, que destaca quatro picos bem definidos, onde o terceiro elui na posição correspondente ao peso molecular da crotoxina.

As frações referentes ao pico desta proteína foram reunidas, liofilizadas e recromatografadas em Sephadex^R G-100 e o perfil resultante está ilustrado na Fig. 2.

As frações recromatografadas foram precipitadas no ponto isoelétrico da crotoxina, pH 4,7, para melhorar a purificação. Observou-se que com este processo, ocorreu uma perda da ordem de 25 % do conteúdo protéico inicial. Esta fração precipitada foi denominada crotoxina nativa. Todo o rendimento desta purificação pode ser visto na Tabela 5.

Fig.1-Perfil cromatográfico em Sephadex G-75 de 150 mg de veneno crotálico



**Fig.2 - Recromatografia em Sephadex G100
de 40 mg de crotoxina isolada de veneno
total**

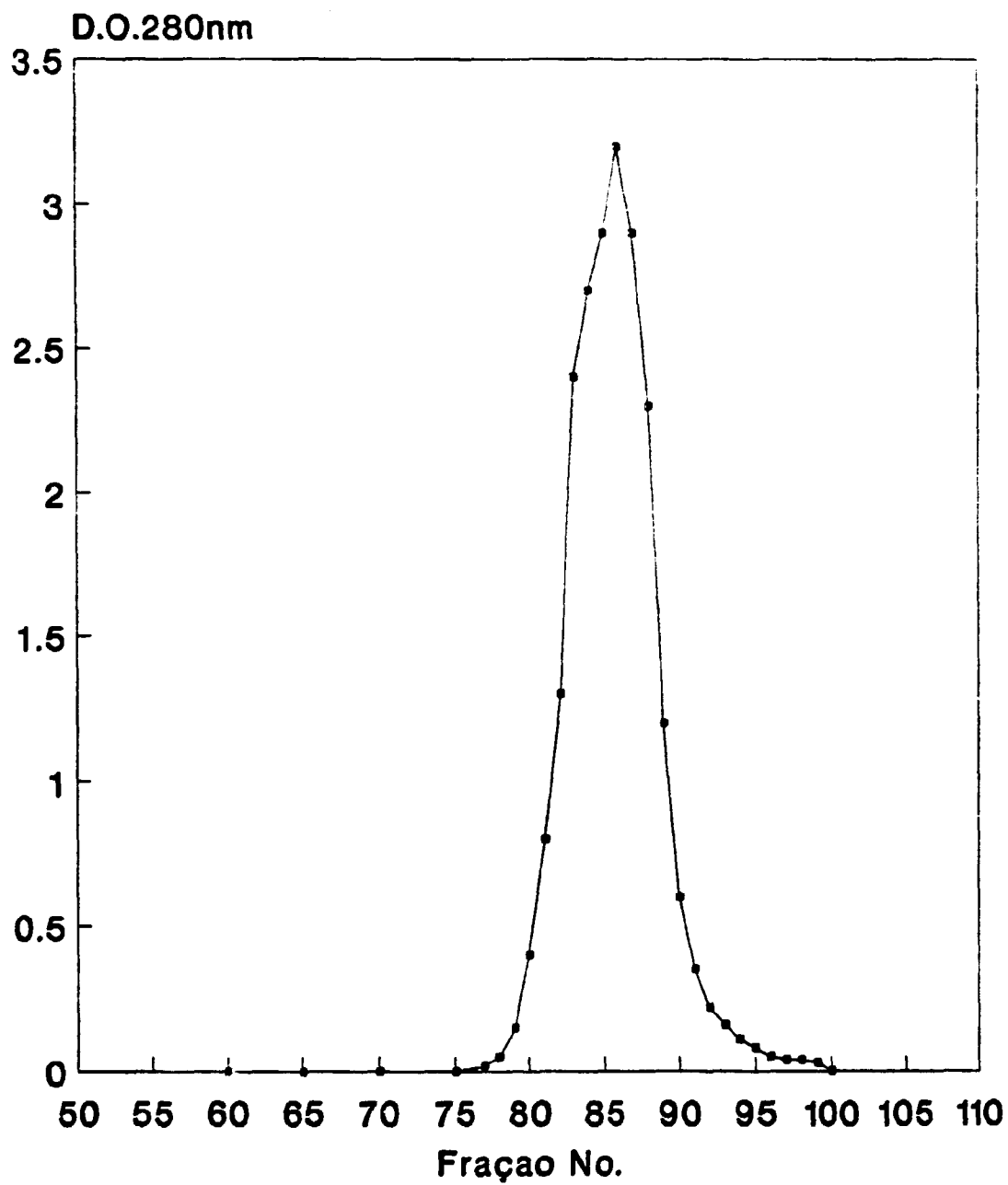


Tabela 5.

	Proteína final	% do Inicial	% por fase
Veneno total	150mg	100	100
Pós cromatografia em G-75	60mg	40	40
Recromatografia em G-100	60mg	40	100
Precipitação no pl	45mg	30	75

A irradiação com 2000 Gy de 10 mg de proteína purificada, como descrito em Métodos, mostrou manutenção de sua solubilidade, com recuperação de 100% ao final do processo. Este resultado só foi conseguido após o uso de salina acidificada como diluente da crotoxina antes da irradiação. Esta fração foi denominada crotoxina irradiada.

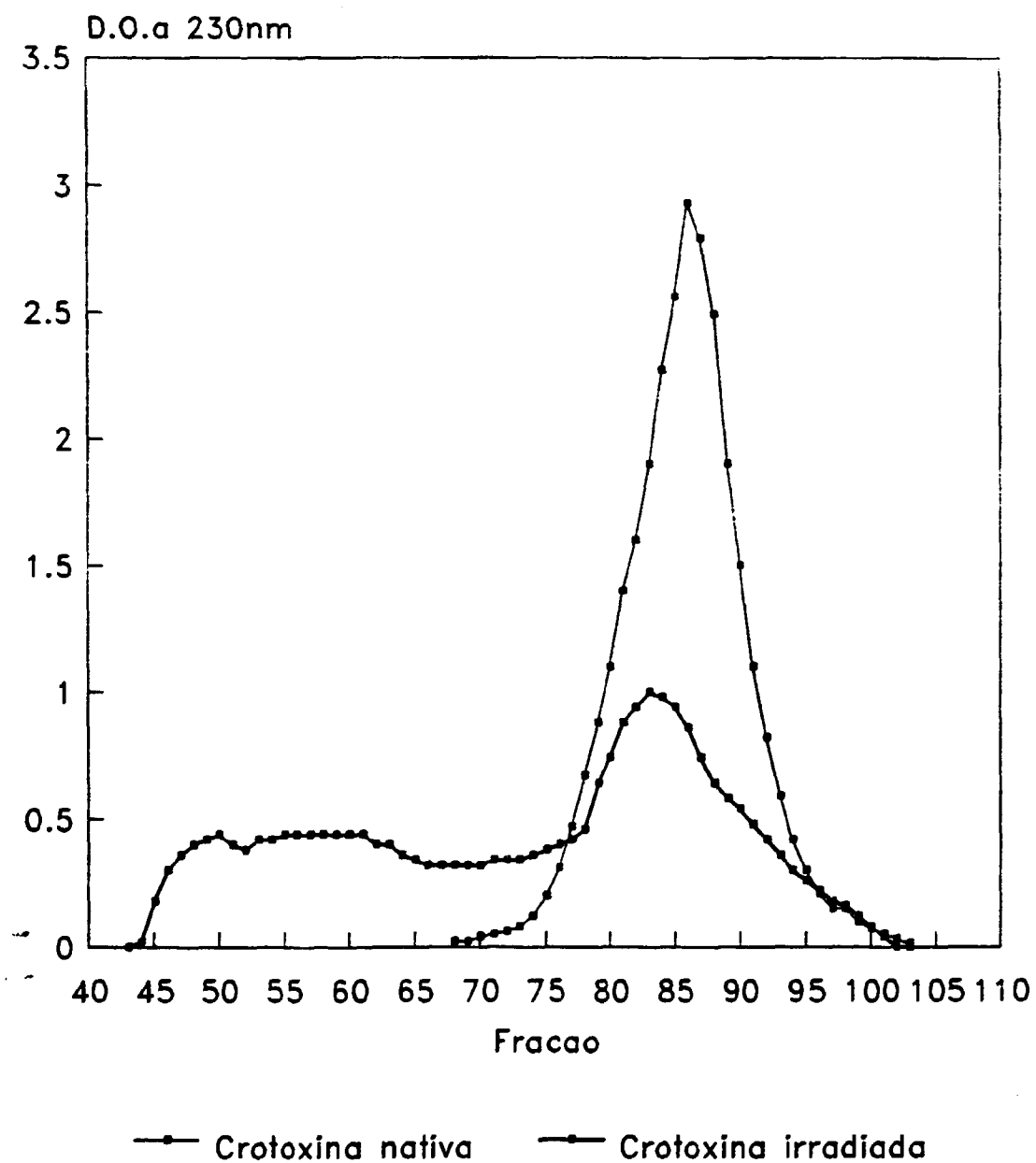
2 - Testes Analíticos da Crotoxina Nativa ou Irradiada

2.1 - Crotoxina nativa e irradiada comparadas pela cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia em Sephadex^R G-75 foi executada com crotoxina nativa e irradiada em condições idênticas, sequencialmente.

A Fig. 3 ilustra os perfis cromatográficos obtidos de crotoxinas nativa e irradiada, onde o pico principal de eluição de ambas as proteínas é coincidente. A diferença entre as densidades ópticas obtidas é bastante representativa, além de aparecerem frações de peso molecular mais elevado e distribuição heterogênea na cromatografia da crotoxina irradiada, divergindo da crotoxina nativa que apresenta um único pico.

Fig.3 -Recromatografia de exclusao mole-
cular de crotoxina purificada nativa ou
irradiada



2.2 - Imunodifusão.

Na imunodifusão contra soro hiperimune de cavalo anti-veneno crotálico total, mostrada na Fig. 4, podemos observar que a precipitação no pl elimina as linhas de contaminação, detectáveis nas fases anteriores a esse processamento. Convém salientar que a crotoxina irradiada conserva o mesmo padrão de antigenicidade e pureza apresentados pela crotoxina nativa, apesar da presença de precipitado protéico no orifício de sua aplicação.

2.3 - Eletroforese

Vista na Fig. 5, a eletroforese em gel de poliacrilamida mostra um alto grau de pureza para a crotoxina nativa precipitada no pl. A proteína irradiada apresenta a banda correspondente à proteína nativa, entretanto outras frações de peso molecular mais elevado e distribuição heterogênea são observadas.

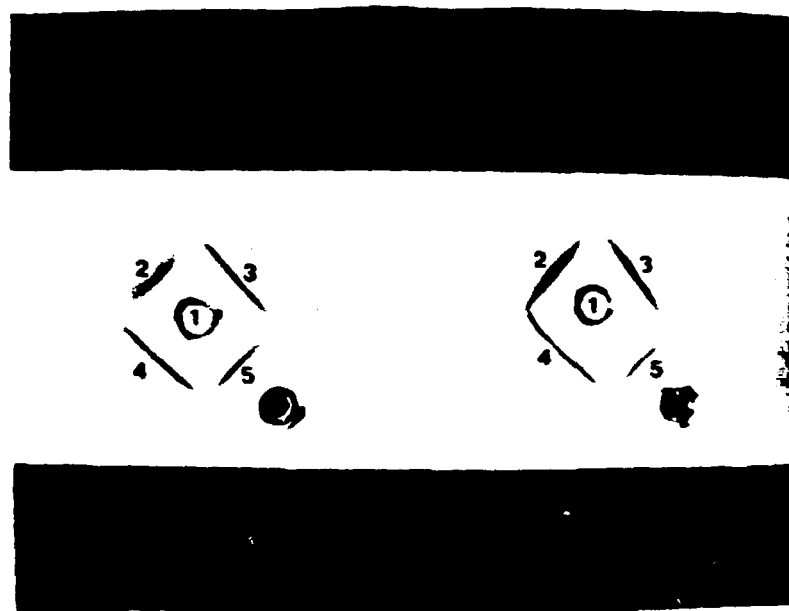


Fig.4 - Reação de imunodifusão em ágar-ágar de veneno crotálico total e frações contra soro hiperimune de cavalo. 1- Soro anticrotálico total; 2- Veneno total; 3- Crotoxina nativa, purificada apenas por exclusão molecular; 4- Crotoxina nativa , após precipitação no pI; 5- Crotoxina irradiada.

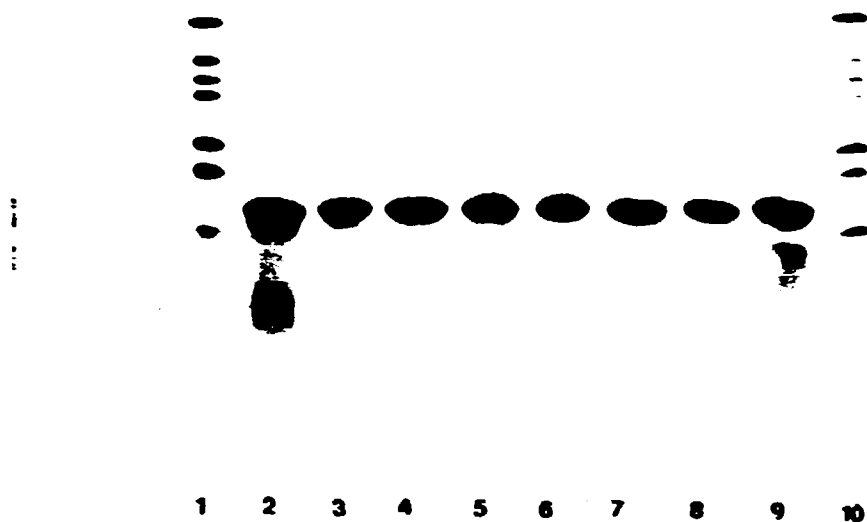


Fig.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo com SDS, corada pelo Coomassie Brilliant Blue R-250. As amostras foram pré tratadas com úrea e beta mercapto etanol.

1 e 10 - Padrões de peso molecular

2 e 9 - Veneno Total de *C.d.terrificus*

3 e 4 - Crotoxina isolada por exclusão molecular

5 e 6 - Crotoxina irradiada

7 e 8 - Crotoxina precipitada no pI

2.4 - Espectro de absorção

Observando-se a Fig.6, notamos que o coeficiente de extinção molar da crotoxina irradiada, principalmente na faixa de 250 a 290 nm é maior do que a encontrada para a crotoxina nativa.

2.5 - Determinação da atividade tóxica (DL₅₀)

A toxicidade de cada amostra foi determinada em camundongos albinos machos pelo cálculo da dose letal 50%(DL₅₀), segundo o método de Spearman-Kärber⁹⁰

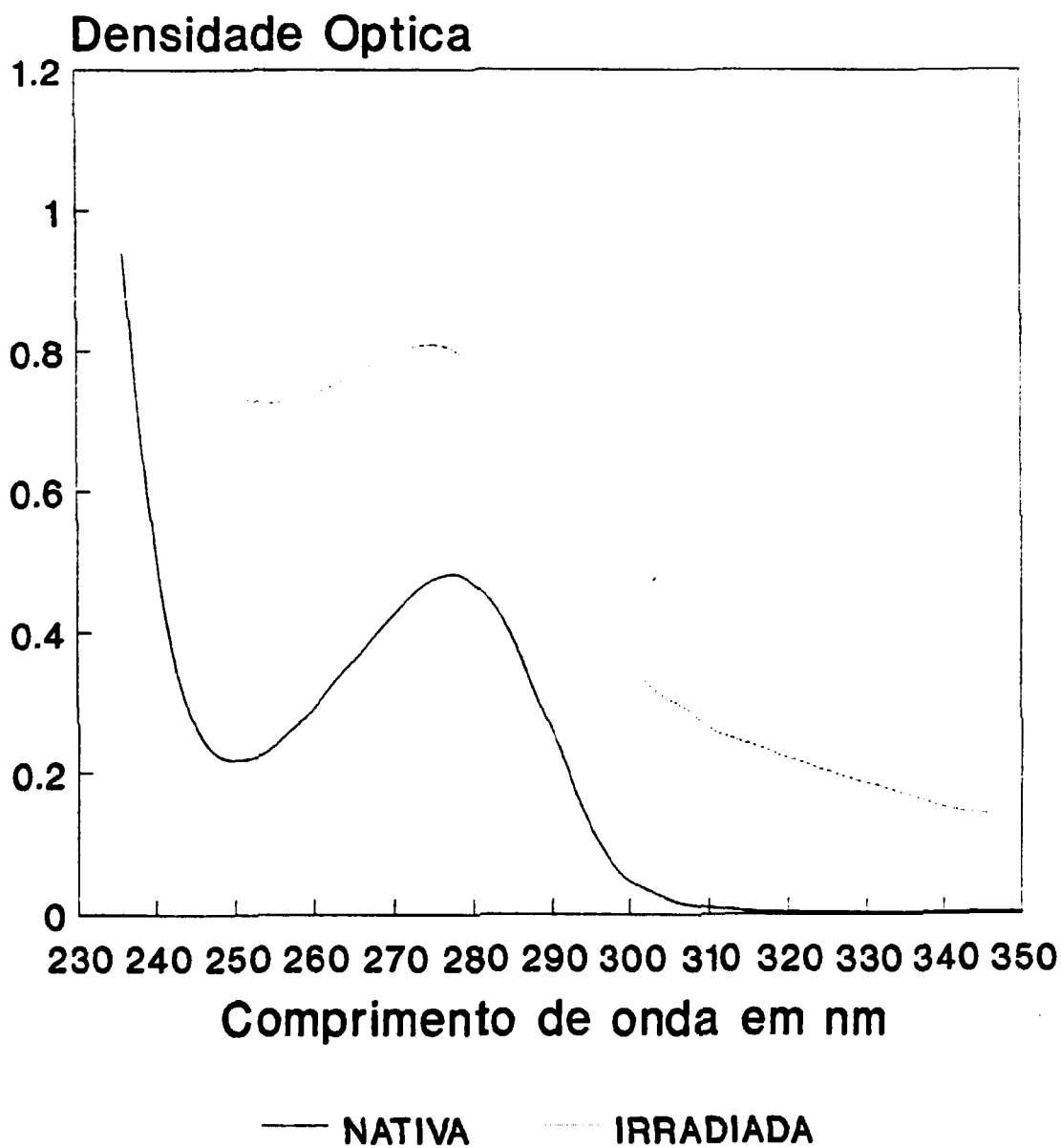
A tabela 6 mostra as várias concentrações usadas para cada proteína testada, bem como as respectivas taxas de mortalidade após um período de observação de 24 hs.

Tabela 6

Porcentagem de mortalidade de animais inoculados com crotoxina nativa ou irradiada.

Crotoxina nativa	% Mortalidade	Crotoxina irradiada	% Mortalidade
Dose utilizada(ug/kg)		Dose Utilizada(ug/kg)	
53,5	0	804	0
70	33.33	965	33.33
91	66.66	1158	50
118,5	100	1390	66.66
154	100	1670	66.66
200	100	2000	100
DL ₅₀ = 79.95 (67,3-95)		DL ₅₀ = 1230 (1046-1445)	

Fig.6-Espectro de Absorção na região ultravioleta de amostras de crotoxina ou irradiada(140ug/ml) em salina



A Fig. 7 mostra a DL₅₀ das crotoxinas testadas, bem como o intervalo de confiança de 95% destas medidas, onde podemos verificar uma diminuição de toxicidade da crotoxina, causada pela irradiação, da ordem de 15 vezes.

2.6 - Imunogenicidade das crotoxinas nativa ou irradiada em camundongos

As imunizações de camundongos com a crotoxina nativa ou irradiada mostraram uma capacidade de produção de anticorpos semelhantes, conforme pode ser visto nas figuras Fig 8a e Fig 8b. Notamos que a crotoxina irradiada comporta-se de maneira similar à crotoxina nativa na indução de anticorpos que reconhecem tanto o veneno total quanto crotoxina purificada.

Observando-se a sobrevivência dos animais após o desafio, notamos que as respostas foram diferentes das esperadas, pois para mesmos títulos de anticorpos anti-veneno total, encontramos diferentes mortalidades após o desafio com 10 DL₅₀.

Os animais imunizados com a crotoxina nativa, ao receberem o desafio, apresentaram apenas 20% de proteção (mortalidade de 80%), enquanto que os animais imunizados com crotoxina irradiada apresentaram proteção de 100%, sem a ocorrência de morte.

2.7 - Obtenção de Crotoxina marcada, por iodação, com ¹²⁵I.

Os perfis cromatográficos resultantes da exclusão molecular de 5μg de crotoxina purificada, nativa ou irradiada, submetidos a marcação com ¹²⁵I podem ser vistos nas figuras Fig.9 e Fig.10 respectivamente.

**Fig.7 - DL50 de crotoxina purificada
nativa ou irradiada, determinada em
camundongos**

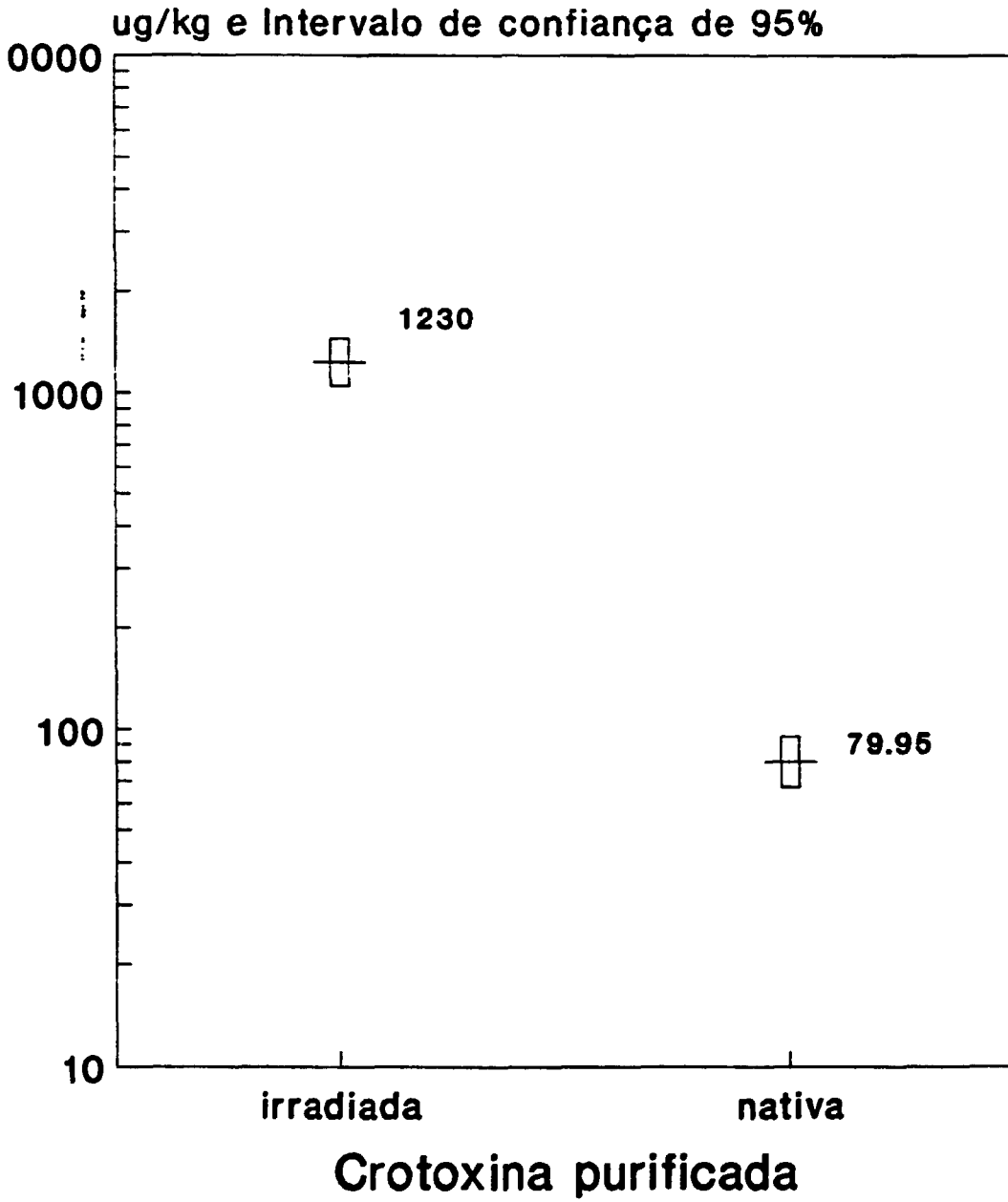


Fig.8a - Producao de anticorpos anti-crotovina, revelados por ELISA, com diferentes antigenos.

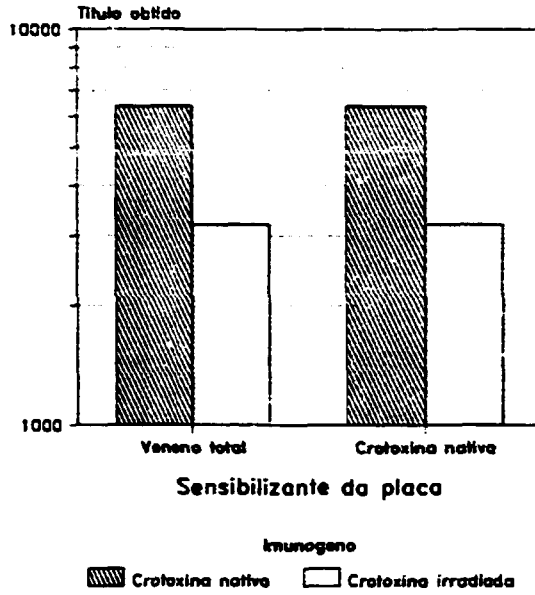
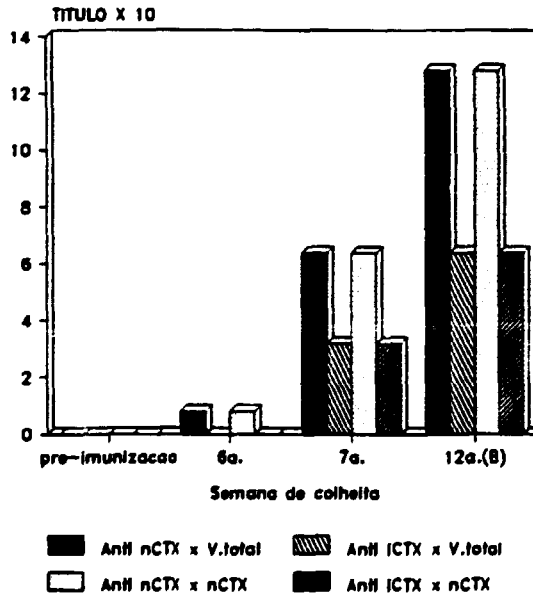


Fig.8b - Titulos de anticorpos obtidos em camundongos apos imunizacao com crotovina nativa (nCTX) ou irradiada (iCTX)



Podemos identificar em cada um dos perfis das marcações, 4 frações isoladas, onde a primeira corresponde ao volume de exclusão, seguida pelo pico de agregados de pesos moleculares maiores e albumina; a terceira fração é referente à crotoxina marcada, e a quarta, ao iodo livre e produtos de degradação.

2.8 - Precipitação do complexo Antígeno-Anticorpo com Polietilenoglicol (PEG)

Podemos observar na Fig.11 que o processo de marcação não interferiu na reação do soro hiperimune anticrotálico com a crotoxina tanto nativa quanto irradiada.

2.9.- Análise de aminoácidos

A tabela 7 mostra os dados obtidos pela análise de aminoácidos das crotoxinas nativa e irradiada, representando a média de duas determinações.

Fig.9 - Cromatografia em Sephadex G-100 da crotoxina nativa marcada com 125I.

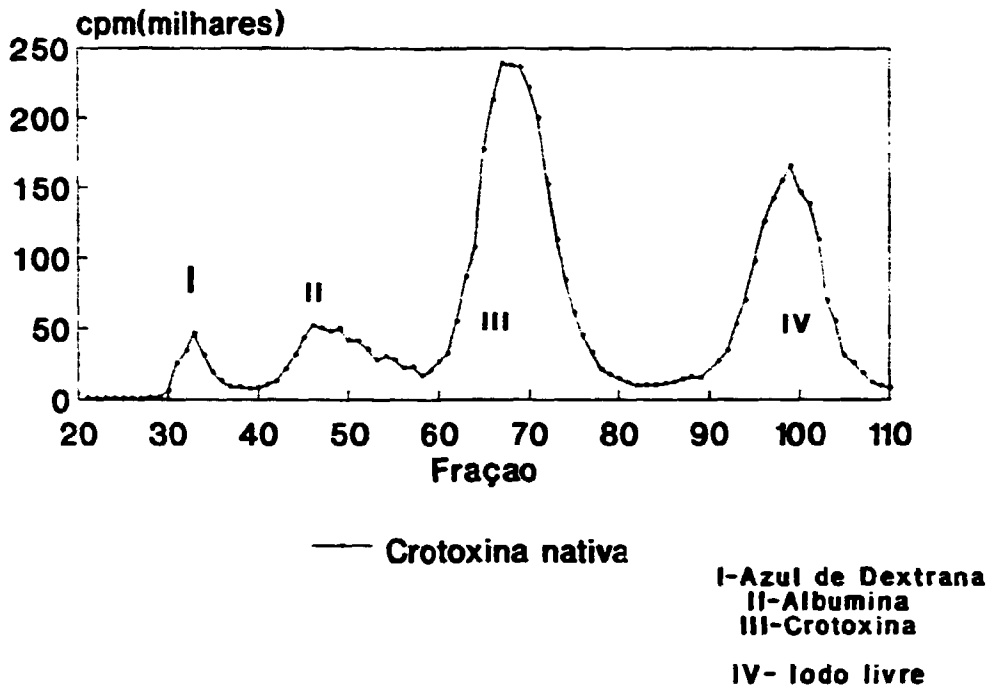


Fig.10 - Cromatografia em Sephadex G-100 de crotoxina irradiada marcada com 125I.

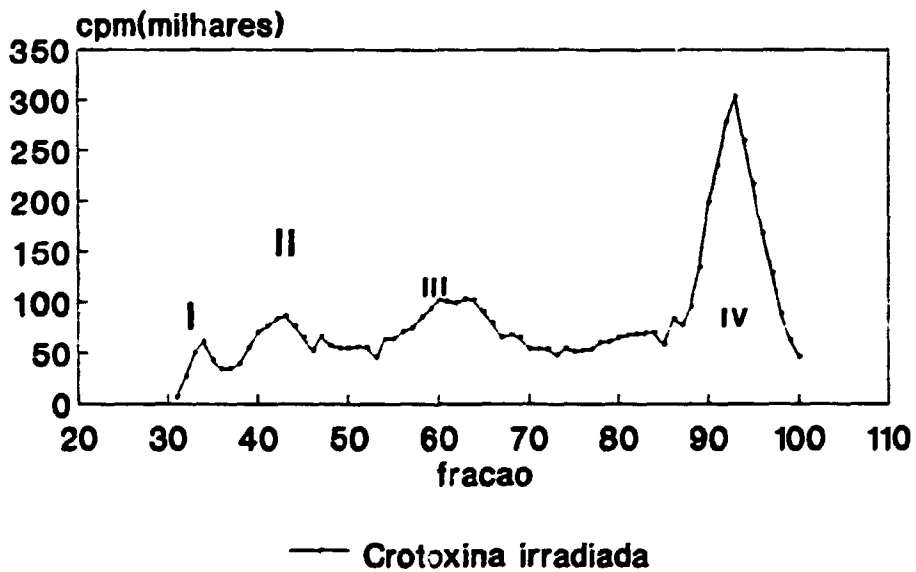


TABELA 7 - Aminograma de crotoxina nativa e irradiada, expressos em moles de aminoácido por mol de crotoxina

Aminoácido	Crotoxina Nativa	Crotoxina Irradiada
Lisina	11,24	10,62
Histidina	3,08	2,73
Arginina	11,70	11,47
Triptofano	4,47	3,42
Ác. aspártico	19,00	17,50
Treonina	10,38	8,33
Serina	9,69	7,99
Ác. glutâmico	20,06	17,16
Prolina	8,82	7,79
Glicina	17,01	16,31
Alanina	11,20	10,52
1/2 Cistina	23,10	17,68
Valina	2,56	2,21
Metionina	3,40	2,89
Isoleucina	5,98	4,76
Leucina	6,46	5,95
Tirosina	13,15	11,39
Fenilalanina	8,70	8,31

2.10 - Biodistribuição da crotoxina nativa ou irradiada, marcada com ^{125}I , em órgãos de camundongos

2.10.1 - Biodistribuição da crotoxina nativa

Para esta análise, foram injetados grupos de 10 animais como descrito em Métodos. Estes animais foram sacrificados após 0,25, 1, 2, 3, 5 e 24 hs da injeção. A presença de crotoxina marcada nos diversos órgãos e no plasma foi calculada pela detecção da radiação total no órgão e expressa em cpm/mg de órgão. Os resultados da biodistribuição da crotoxina nativa são apresentados na Fig.12, onde notamos uma retenção da crotoxina pelo rim nas primeiras horas, seguida de retenção em cérebro e músculo passadas 3 horas. Em fígado e baço, a eliminação da crotoxina ocorreu de forma mais lenta, inclusive com discreto acúmulo nos períodos iniciais.

2.10.2 - Biodistribuição da crotoxina irradiada

Conforme descrito em Métodos, para êstes experimentos, foram injetados grupos de 7 animais, com sacrifício nos mesmos períodos utilizados no experimento com crotoxina nativa.

A biodistribuição da crotoxina irradiada pode ser vista na Fig. 13, mostrando que o padrão de distribuição é semelhante ao da crotoxina nativa, exceto no rim, onde a retenção inicial, encontrada na biodistribuição de crotoxina nativa, não foi vista. Em baço e fígado observamos também um perfil semelhante porem com menor concentração de crotoxina irradiada, quando comparada com a nativa

Nas figuras Fig.14 a a Fig.14f podem ser vistas as evoluções da presença de crotoxina nativa comparada com a irradiada nos vários órgãos e plasma, isoladamente.

Fig.12 - Biodistribuição de crotoxina

nativa nos diversos órgãos

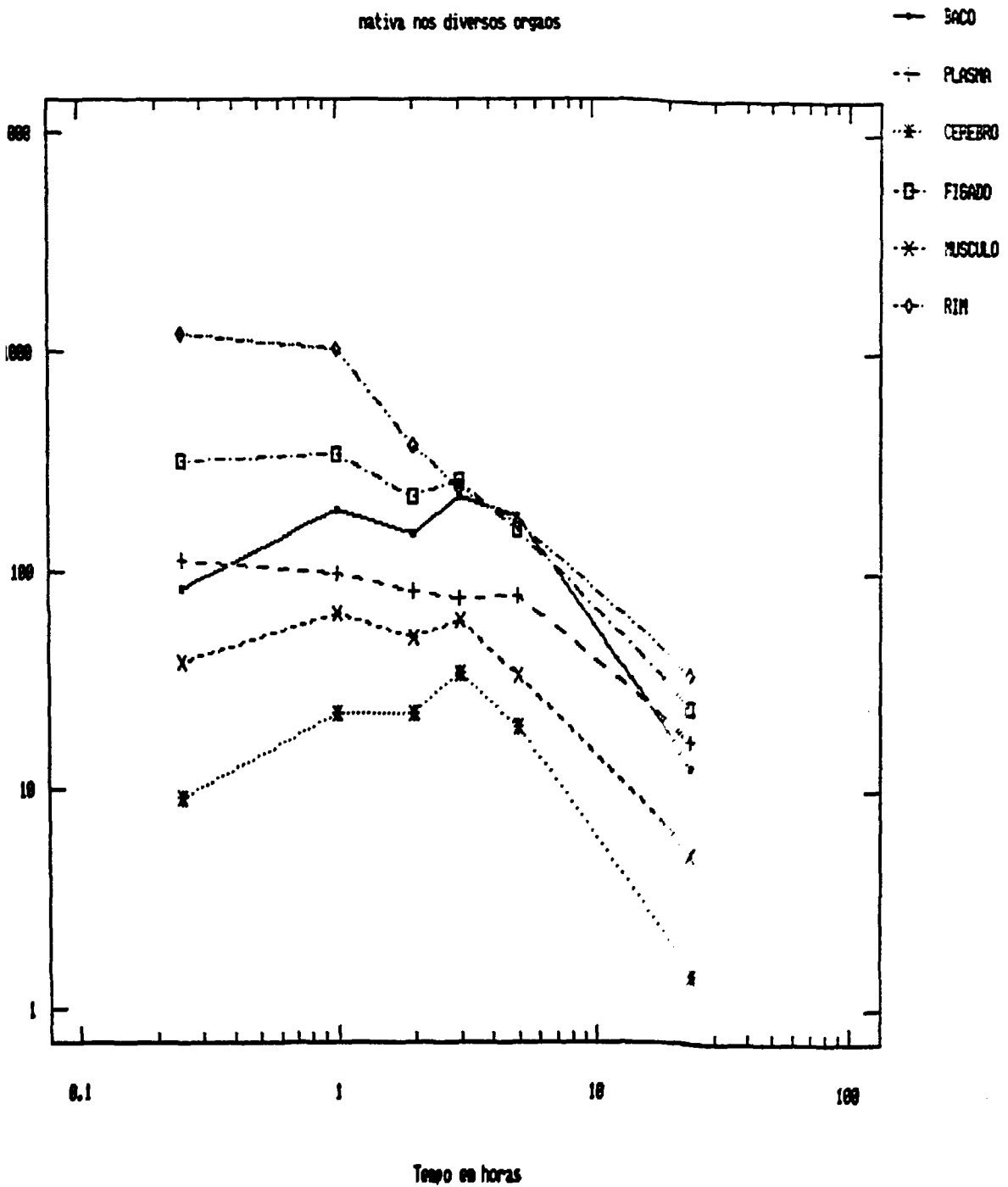
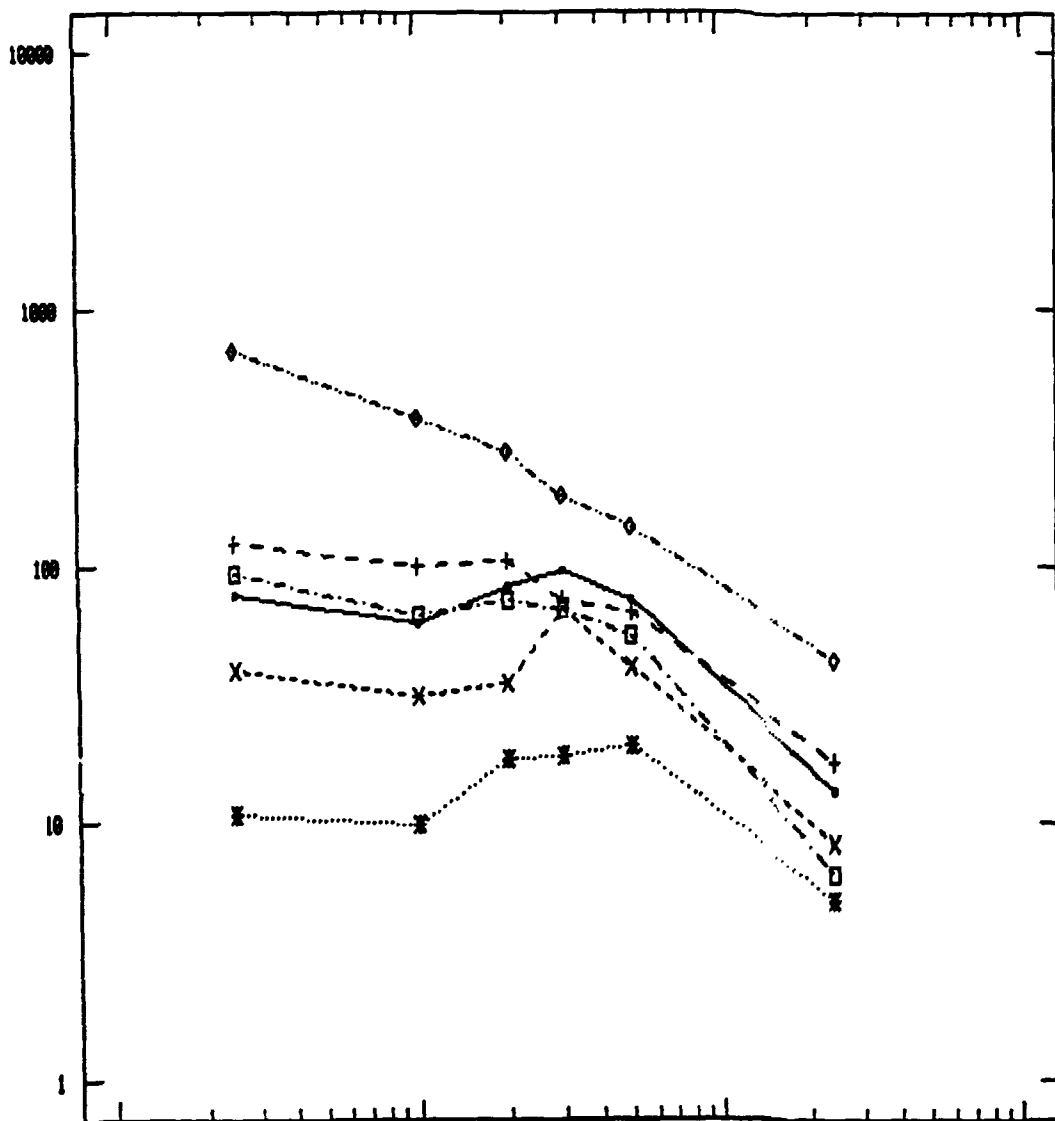


Fig. 13 - Biodistribuição de crotocina

irradiada nos diversos órgãos

- BACO
- + PLASMA
- *· CEREBRO
- G- FIGADO
- *· MUSCULO
- ◇- RIM



Tempo em horas

Fig.14a- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada no plasma

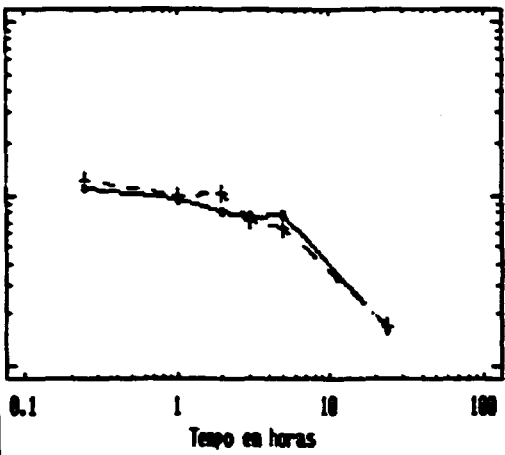


Fig.14b- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada em rim

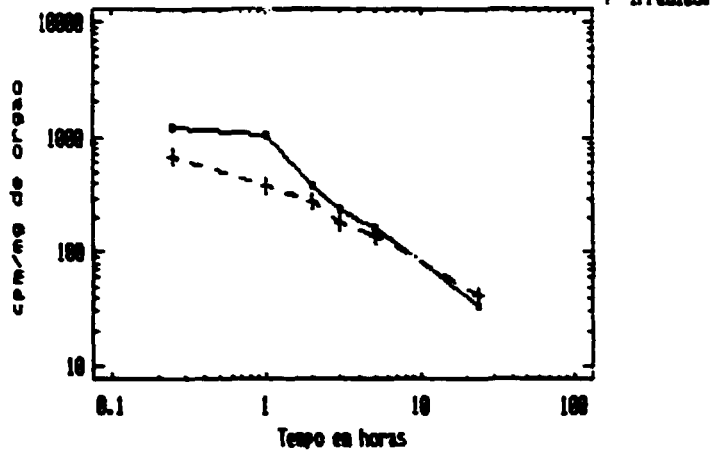


Fig.14c- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada em figado

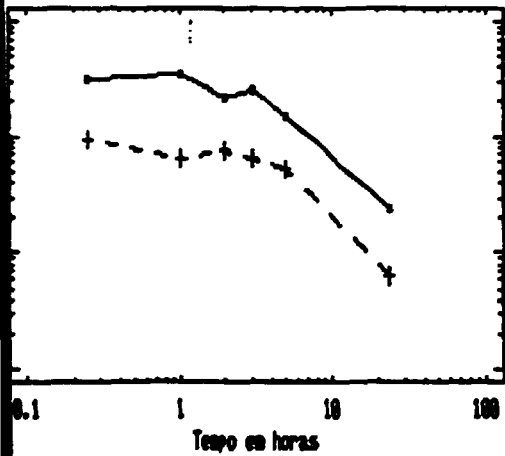


Fig.14d- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada em baco

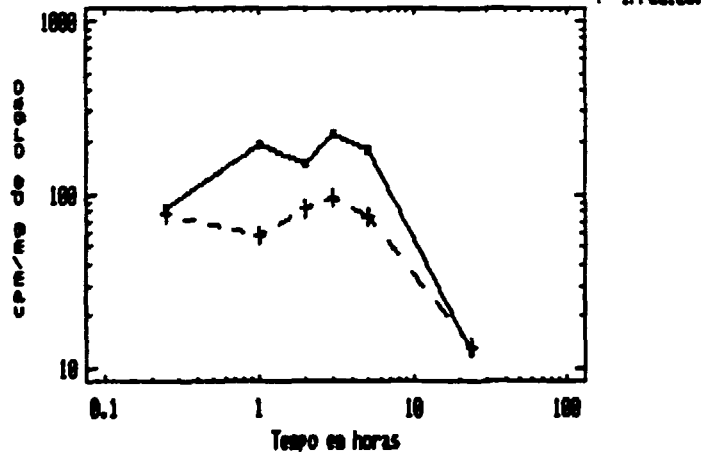


Fig.14e- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada em musculo esquelético

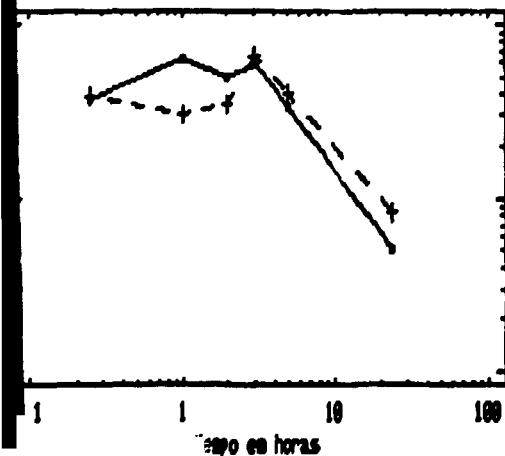
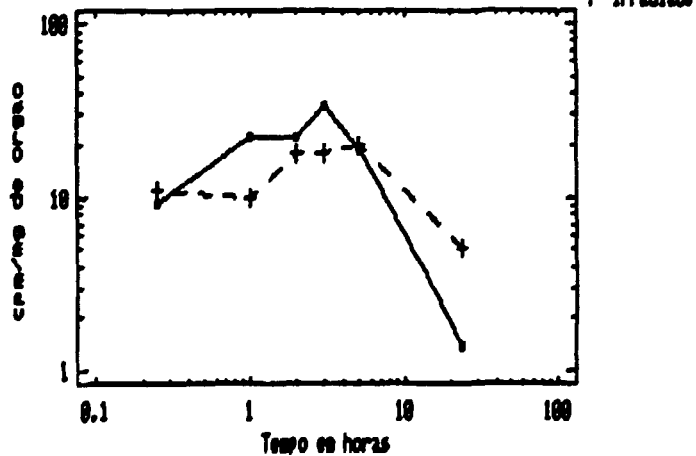


Fig.14f- Distribuicao de crotocina nativa ou irradiada em cerebro



V - DISCUSSÃO

1- Aspectos bioquímicos

A crotoxina utilizada nos experimentos foi parcialmente purificada na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex^R G-75.

Os bons resultados obtidos no isolamento da crotoxina a partir de veneno total, usando a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex^R G-75 corroboraram com aqueles obtidos por Takeda et al.⁸².

O método de Bradford¹⁵ para dosagem de proteínas foi empregado por ter se mostrado mais fidedigno do que o de Lowry⁵⁶. No início do trabalho, foi utilizado este último método e observou-se uma superestimação do conteúdo protéico, o que corrobora com os achados de Darke e cols²⁶ que estudando a fosfolipase, obtiveram valores protéicos maiores que os reais para esta enzima.

Conforme sugerido por Souza Filho⁸¹, a precipitação da crotoxina no pI (pH4,7), também em nosso trabalho, mostrou ser um importante passo para a purificação desta toxina, como pode ser visto na eletroforese e na imunodifusão. Ambos os testes mostraram que a crotoxina assim purificada comportou-se como uma proteína pura.

Entretanto, a irradiação desta fração pura não levou a formação de precipitados protéicos grosseiros, de fácil identificação, diferindo dos resultados observados anteriormente por outros autores, que estudaram irradiação de crotoxina⁸¹ ou mesmo outros venenos⁷, cuja precipitação chegava até a 65% na dose de 2000Gy. Nossos resultados foram alcançados acidificando-se as amostras com salina pH3,0 antes da irradiação.

Os resultados obtidos mostraram alteração de alguns dos aspectos bioquímicos da proteína decorrentes da irradiação.

Através da imunodifusão foi possível perceber que a exposição da proteína aos raios gama não comprometeu a capacidade antigênica da crotoxina, que apresentou linha de precipitação com o soro anti-crotálico semelhante àquela apresentada pela crotoxina nativa.

Entretanto, cabe ressaltar a presença de material depositado no orifício de aplicação da crotoxina irradiada, que não se difundiu, sugerindo tratar-se de agregados protéicos de maior peso molecular, oriundos da ação dos radicais livres liberados durante a irradiação da proteína em solução e que justificam a linha mais fraca de precipitação com o soro, dessa toxina irradiada.

Estes achados diferem dos resultados apresentados por Souza Filho⁸¹ que sugeriu destruição da capacidade antigênica da crotoxina quando irradiada a 2000Gy.

O fenômeno de produção de agregados foi detectado na eletroforese, onde observamos um "arraste" na região de proteínas de peso molecular mais elevado, o que não foi observado na eletroforese de crotoxina nativa.

Baride e cols⁷ observaram o mesmo comportamento quando irradiaram venenos de várias serpentes indianas. Reforçando esta hipótese, observamos, na cromatografia de exclusão molecular de crotoxina irradiada, presença de proteínas de maior peso molecular, quando comparada com a cromatografia da proteína nativa. Guarnieri-Cruz e cols³⁴, estudando a detoxificação do veneno de *B.jararaca* pela radiação gama, obtiveram resultados semelhantes.

Diante destes achados, cabe-nos discutir a ação da radiação em proteínas que se encontram em solução. Neste caso, pela radiólise da água, ocorre formação de radicais livres responsáveis por ligações e alterações inter e intramoleculares nas proteínas, resultando frequentemente em denaturação total ou alterações da estrutura terciária ou secundária da proteína¹⁹.

As mudanças ocorridas na proteína devido a irradiação são também detectáveis pelas alterações no espectro de absorção, mostrando que a crotoxina irradiada, comparada com a nativa, apresenta um maior coeficiente de extinção molar, principalmente na faixa de 250 a 300 nm. Este fato indica que grupos cromóforos, como fenilalanina, tirosina e triptofano, antes protegidos, tornaram-se expostos com a irradiação, por um possível desdobramento da molécula^{2,7,64}. Estes dados bioquímicos corroboram totalmente os achados de outros pesquisadores que têm estudado a detoxificação de venenos através da radiação ionizante^{34,61,62,81}.

A marcação das proteínas com ¹²⁵I não foi idêntica para as proteínas nativa e irradiada, sendo que nesta última foram encontradas dificuldades durante a marcação, como sua parcial insolubilidade em pH neutro em particular.

É notória a importância do pH na marcação, dado que marcações efetuadas em pHs diferentes de 7,4, como por exemplo em pH 8,0 resulta em incorporação do iodo sendo feita pela histidina e não pela tirosina, resíduo que normalmente incorpora este radioisótopo em pH 7,4.

Pelos achados de Sato e Tamiya⁷⁶, a iodação de mais de uma histidina leva a perda de atividade desse resíduo, que, segundo Volwerk e cols⁸⁹, parece fazer parte do centro ativo da crotoxina.

Essas informações somadas ao fato da crotoxina precipitar em pH 8,0, nos faz descartar a possibilidade de uma marcação nesse pH.

Aventou-se também a possibilidade de se fazer a marcação em pH mais baixo como pH 3,0 (pH ótimo para a crotoxina), no entanto, nesse pH ocorre volatilização do iodo que leva a uma marcação de baixa atividade específica e a sérios perigos de saúde para o operador.

Mediante tais circunstâncias, a marcação teve que ser feita no pH 7,5, considerado ótimo para iodação de proteínas em geral, tendo sido necessárias maiores quantidades de proteína irradiada para se fazer uma boa marcação e obter no final quantidade suficiente de produto marcado solúvel para os testes de biodistribuição.

Devido a estas dificuldades foi feita uma comparação entre a análise de aminoácidos da proteína irradiada e a análise dos resíduos da proteína nativa, no intuito de se investigar se a irradiação não teria levado a uma alteração no número de moléculas de tirosina da cadeia polipeptídica, pois existem relatos na bibliografia de diminuição do número destes resíduos nas moléculas submetidas à irradiação²⁰.

Isto justificaria a baixa incorporação do iodo na molécula.

Comparando-se o número de resíduos apresentados pela crotoxina nativa com aquele apresentado pela proteína irradiada, observou-se que os resíduos que apresentaram diferenças percentuais significativas (acima de 20%) foram Triptofano e 1/2 cistina, moléculas reconhecidamente afetadas pela radiação ionizante.

- A primeira por fazer parte dos aminoácidos aromáticos que por serem bons captadores de íons sofrem ataques dos radicais livres.^{7,18,19,64}.

- A cisteína por possuir grupamentos sulfidrilas também se mostra altamente afetada pelos raios gama¹⁹, funcionando inclusive como "scavenger" de OH devido a sua alta reatividade²⁴.

O número de tirosinas não se mostrou alterado após a irradiação. Este aspecto confirma os achados de espectro de absorção onde parece haver uma maior exposição de grupos cromóforos e não sua destruição.

2- Aspectos Imunológicos

A irradiação não afetou significativamente a capacidade antigênica da crotoxina, revelada pela imunodifusão com soro hiperimune de cavalo. Estes achados foram confirmados pela precipitação de imunocomplexos de crotoxina nativa ou irradiada, marcadas com ¹²⁵I, e soro hiperimune de cavalo, não tendo a marcação com ¹²⁵I afetado esta antigenicidade. Reforçando este último dado temos os achados de Muniz e cols⁶⁰, que mostraram preservação das propriedades biológicas das proteínas submetidas à marcação com ¹²⁵I.

Os títulos do soro produzido em camundongos imunizados com crotoxina irradiada, detectados pelo método de ELISA contra veneno total ou crotoxina purificada, foram semelhantes aos títulos do soro obtido com crotoxina nativa. Esses dados nos mostram que a capacidade imunogênica da proteína foi mantida após a irradiação. Cabe lembrar que Baride e cols⁷ e Guarnieri Cruz e cols³³, estudando a detoxificação de veneno de outras espécies através da radiação ionizante encontraram resultados semelhantes.

Considerando-se ainda os resultados obtidos após o desafio, podemos inferir que os anticorpos induzidos por crotoxina irradiada parecem ser mais "eficientes" que aqueles produzidos pela crotoxina nativa, talvez por uma proporção maior de anticorpos protetores, resultando em maior eficiência na detoxificação do veneno.

Baride e cols⁷ postularam que as proteínas de alto peso molecular formadas pela irradiação dão imunidade contra os fatores tóxicos do veneno. Este fato talvez justifique a maior eficiência da crotoxina irradiada na indução de anticorpos se considerarmos que os agregados, formados devido a irradiação, contribuem, e como bons imunógenos, na produção de anticorpos anti-crotoxina irradiada.

Ainda sobre os agregados, podemos sugerir que esta agregação dificulta sua disseminação pelo organismo, impedindo sua chegada em concentrações ótimas nos locais de ação e conseqüentemente, tornando-os menos tóxicos.

3- Aspectos Farmacológicos

Ao analisarmos a DL₅₀ comparativa entre crotoxina nativa e irradiada, obtivemos para esta última uma diminuição da toxicidade da ordem de 15 vezes, confirmando os dados obtidos por Murata em 1990⁶², que estudando o veneno total de *C. durissus terrificus* conseguiu detoxificá-lo após irradiação.

No entanto, essa detoxificação de veneno total pela irradiação, executada nas mesmas condições utilizadas em nossos experimentos, foi da ordem de 3 vezes menor que a detoxificação da crotoxina pura, sugerindo ser essa proteína a fração mais afetada durante a irradiação do veneno total.

Esses achados conferem com os de Baride e cols⁷, que estudando a neurotoxina e cardiotoxina de *Naja naja* sugeriram que estas toxinas são mais sensíveis a ação detoxificante do que o veneno total. Mais tarde, Skalka e Antoni⁷⁹ sugeriram que amostras não purificadas são mais radiorresistentes do que frações puras, provavelmente devido à proteção mútua dos componentes presentes.

Ao analisarmos a biodistribuição comparativa entre a crotoxina nativa e irradiada, percebemos que a irradiação não alterou o padrão geral de distribuição nos órgãos. O rim se mostrou o principal órgão de eliminação tanto da crotoxina nativa como da proteína irradiada, fato que corrobora com os achados de Lomba⁵⁵ e Habermann e cols³⁶.

Entretanto, na primeira hora após o inóculo, notamos uma retenção da crotoxina nativa em rim enquanto que a crotoxina irradiada não mostrou fixação a esse órgão em momento algum.

Este achado é importante e certamente deve ser aproveitado no intuito de elucidar o mecanismo de ação da crotoxina nativa.

Sabe-se que o envenenamento crotálico leva a uma insuficiência renal aguda, culminando com morte⁸⁸.

A crotoxina nativa apresentou maior concentração inicial em rim com excreção subsequente divergindo da irradiada, que é excretada com velocidade constante. Essa concentração inicial pode representar o aparecimento de lesão renal¹ pela exposição prolongado do rim à toxina.

Tanto a crotoxina nativa como a irradiada tem afinidade por órgãos ricos em Sistema Fagocítico Mononuclear, representados em nossos experimentos pelo fígado e baço³⁶. Ambas as proteínas concentram-se nesses órgãos nas primeiras horas e começam a ser clareadas após 3 horas. Ainda nesses órgãos convém salientar que a concentração de crotoxina nativa encontrada foi superior a da irradiada.

O cérebro e o músculo, órgãos ricos em terminações nervosas apresentaram níveis de concentração inferiores aos encontrados em baço e fígado, contudo o tempo de retenção das toxinas nesses órgãos também chega a 3 horas.

A presença de crotoxina irradiada em concentrações semelhantes às encontradas de crotoxina nativa mostra que pelo menos em relação à afinidade por receptores específicos a crotoxina não foi afetada pela radiação, embora nada possamos inferir sobre sua ação tóxica local^{12,36}.

Dessa forma, podemos evidenciar 04 destinos para a crotoxina inoculada, a saber:

- 1- Clareamento pelo rim, por filtração simples, que ocorre principalmente com crotoxina irradiada;
- 2- Ligação precoce no rim, podendo levar a agressão local com insuficiência renal, demonstrada para crotoxina nativa;
- 3- Ligação em órgãos ricos em Sistema Fagocítico Mononuclear(SFM), provavelmente pelo clareamento de complexos crotoxina-células;
- 4- Ligação em órgãos ricos em terminações nervosas.

VI - CONCLUSÕES

1- A radiação gama de Cobalto-60, por induzir a produção de radicais livres e quebras protéicas, altera bioquimicamente a crotoxina:

a) modificando o seu espectro de absorção na região de 250 a 300 nm,

b) podendo gerar, em pequena proporção, produtos de pesos moleculares maiores,
e

c) diminuindo a proporção de aminoácidos, em particular triptofano e cisteína.

2- As propriedades antigênicas e imunogênicas da crotoxina estão preservadas após a irradiação.

3- A atividade farmacológica da crotoxina após a irradiação foi alterada, resultando em um aumento da DL₅₀ nos animais testados, da ordem de 15 vezes.

4- A biodistribuição geral de crotoxina após a irradiação é semelhante à da crotoxina nativa, embora existam algumas diferenças qualitativas, observadas na distribuição renal e quantitativas, no fígado e baço.

- 1-AMORIM, M.F., FRANCO-DE-MELLO, R. & SALIBA, F. - Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo comparativo das lesões. *Mem.Inst.Butantan* **23**:63-108, 1951
- 2-ANANTHANARAYANAN, V.S. & BIGELOW, C.C. - Unusual difference spectra of proteins containing tryptophan. II Studies with proteins. *Biochemistry* **8**:3723-3728, 1969
- 3-AZEVEDO-MARQUES, M.M., CUPO,P. & HERING, S.E. - Detecção precoce da mioglobina em acidente crotálico humano. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **19S**:Abs.010, 1986
- 4-AZEVEDO-MARQUES, M.M., COIMBRA,T.M., LAURE,C.J., LACHAT,J. & FUJII,A.A. - Ação miotóxica sistêmica de veneno crotálico total crotamina positivo (VCTC⁺) e crotamina negativo (VCTC⁻). *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **19S**:Abs.012, 1986
- 5-AZEVEDO-MARQUES, M.M., CUPO,P., COIMBRA,T.M., HERING,S.E., ROSSI,M.A. & LAURE, C.J. - Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake(*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* **23**:631-636, 1985
- 6-AZEVEDO-MARQUES, M.M., HERING, S.E. & CUPO, P. - Evidence that *Crotalus durissus terrificus* envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* **25**:1163-1168, 1987
- 7-BARIDE, R.M.; JAIN, S.D. & GAITONDE, B.B. - Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J.Med.Res.* **72**:571-6, 1980
-

- 8-BARRABIN, H., MARTIARENA, J.L, VIDAL,J.C. & BARRIO, A.- Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In *Toxins: Animal, Plant and Microbial*, p.133, Ed.ROSENBERG,P., Oxford and New York, Pergamon, 1978
- 9-BARRIO,A. & VITAL-BRAZIL, O. - Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* poisons. *Acta Physiol.Lat.Am.*1:291, 1951
- 10-BERCOVICI, D., CHUDZINISKI, A.M., DIAS, W.O., ESTEVES, M.I., HIRAICHI, E., OISHI, N.Y., PICARELLI, Z.P., ROCHA, M.C., UEDA, C.M.P.M., YAMANOUYE, N & RAWI - A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem.Inst.Butantan* 49:69-78, 1987
- 11-BIEBER, A.L., MILLS,J.P.,Jr., ZIOLKOWSKI,C. & HARRIS, J. - Rattlesnake neurotoxins: Biochemical and Biological aspects. *J.Toxicol.-Toxin Reviews.* 9:285-306, 1990
- 12-BON, C., CHANGEUX, J.P., JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits *Eur.J.Biochem.* 99:471-481, 1979
- 13-BON,C., RADVANYI,F., SALIOU,B. & FAURE,G. - Crotoxin: A biochemical analysis of its mode of action. *J.Toxicol-Toxin Reviews* 5:125-128, 1986
- 14-BON,C., BOUCHIER,C., CHOUMET,V., FAURE G., JIANG, M., LAMBEZAT, M.P., RADVANYI, F. & SALIOU, B. - Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin *Acta Physiol.Pharmacol.Lationam.* 39:439-448, 1989
- 15-BRADFORD, M.M - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding - *Anal.Biochem.*72:248-254, 1976

- 16-BREITHAUPT, H.- Neurotoxic and myotoxic effects of Crotalus Phospholipase A and its complex with Crotopotin - Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol 292:271-278, 1976
- 17-BREITHAUPT, H. - Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex - Toxicon 14:221-233, 1976
- 18-BUTLER,J., HOEY, B.M. & SWALLOW, A.J. - Radiation chemistry Ann.Rep.Progress Chem. 83:129-175, 1987
- 19-BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW,A.J.- Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat.Phys.Chem. 24:273-82, 1984
- 20-CHANDERKAR, L.P., GURNANI, S. & NADKARNI, G.B. - The involvement of aromatic amino acids in biological activity of bovine fibrinogen as assessed by Gamma irradiation Radiation Res.65:283-291, 1976
- 21-CHARD, P. - Ammonium sulphate and Polyethylene glycol as reagents to separate antigens from antigen-antibody complex in Immunochemical Techniques ed. Vunakis,H.V. & Langone,J.J. in Methods in Enzymology(Colanick,S.P. & Kaplan, N.A.) 70 Part A, 1980
- 22-COSTA, L.M., TAKEDA, A.K., BARBOSA, S.F.C., BERRA, J.A.P., ADELINA, M.G.F., SOERENSEN, B., PINTO, J.R. & VANCETTO, M.D.C. - Estudo comparativo da resposta imune em cavalos ao veneno de Crotalus durissus terrificus, in natura,tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. Vacinas e Soros, 1:24-29, 1985

- 23-COSTA, T.A. - Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)
- 24-CZAPSKI, G.- On the use of OH scavengers in biological systems. *Isr.J.Chem.*24:29-32, 1984
- 25-DANIEL, J.P.; HENEINE, L.G.D.; TAVARES, C.P.A.; NASCIMENTO, M.C.S. & HENEINE, I.F.- Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. *Braz.J.Med.Biol.Res.*20:713-20, 1987
- 26-DARKE,P.L., JARVIS,A.A., DEEMS & DENNIS, E.A. - Further characterization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2 - *Biochim.Biophys.Acta* 626:154-161, 1980
- 27-FAURE, G. & BON, C. - Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 27:730-738, 1988
- 28-FLOWERS, H.H. - Effects of γ -Irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus*(cottonmouth moccasin) venom. *Toxicon* 3:301-304, 1966
- 29-FRAENKEL-CONRAT, H. & SILVER, B. - Fractionation and composition of crotoxin. *Arch.Biochem.Biophys.* 60:64-73,1956
- 30-GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, G. - Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I Análise eletroforética. *An.Acad.Bras.Cienc.* 22:141-149, 1950
- 31-GRASSET, E. - Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. *Trans.Royal Soc.Trop.Med.Hyg.* 33:463-488, 1945

- 32-GROSCH, D.S. & HOPWOOD, L.E. - Biological Effects of Radiations. - Ch.2
Direct and indirect action on living matter. pp17-28, 1979, 2nd.ed. Academic
Press - New York
- 33-GUARNIERI-CRUZ, M.C., NASCIMENTO, N., MURATA, Y., SOUZA
FILHO, J.N. & ROGERO J.R. - Immunogenic aspects of *Bothrops jararaca*
venom irradiated with ^{60}Co Rays. In The Pan-American Association of
Biochemical Societies. PAABS: VI Congress Feb 18-22, 1990 - São Paulo,
1990 p.148
- 34-GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y., SOUZA Fo., J.M., NASCIMENTO,
N. & ROGERO, J.R. - Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing
radiation In: International Society on Toxinology PanAmerican Section - III
Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins. Mexico, 9-12 January
1990 - Mexico 1990 ,p 92
- 35-GUIDOLIN, R., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G., CARICATI, C.P.,
LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F., PINTO, J.R. & MARCELINO, J.R. -
Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e
crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem.Inst.Butantan* **51**:85-90, 1989
- 36-HABERMANN, E., WALSH, P. & BREITHAUP, H. - Biochemistry and
Pharmacology of the crotoxin complex - *Naunyn-Schmiedeberg's*
Arch.Pharmacol **273**:313-330, 1972
- 37-HABERMANN, E. & BREITHAUP, H. - The crotoxin - complex - An
example of biochemical and pharmacological protein complementation
Toxicon **16**: 19-30, 1978
- 38-HANLEY, M.R. - Crotoxin effects on *Torpedo californica* cholinergic excitable
vesicles and the role of its phospholipase A activity -
Biochem.Biophys.Res.Comm. **82**:392-401, 1978

- 39-HARLOW, E. & LANE, D. - Antibodies. A laboratory Manual Ed. Cold Spring Harbor Lab. New York, 1988
- 40-HATI, A.K., HATI, R.N., MANDAL, M., PANDA, D. & DAS, S. - The effect of Gamma irradiated detoxified viper venom as a toxoid against viper venom - *The Snake* 21:36-40, 1989
- 41-HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H - Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:1560-1563, 1971
- 42-HENDON, R.A. & TU, A.T. - The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake. Neurotoxic action. *Biochim. Biophys. Acta* 578:243-252, 1979
- 43-HENEINE, I.F., HENEINE, L.G.D., DANIEL, J.P., NASCIMENTO, M.C.S. & ROCHA, O.A. - Properties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination - *Anais da Acad. Ciências Est. S. Paulo* 57II:55-66, 1988
- 44-HENEINE, L.G.D., CARDOSO, V.N., DANIEL, J.P. & HENEINE, I.F. - Detoxification of the T₂ fraction from a scorpion (*Titius serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives - *Toxicon* 24:501-505, 1986
- 45-HERRERA, E., YARLEQUE, A., CAMPOS, S. & ZAVALETA, A. - Gamma irradiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. *Inf. Nucl.* 3:1-14, 1986
- 46-HIGASHI, H.G., GUIDDIN, R., NISHIKAWA, A.K., YAMAGUCHI, I.K., LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F. & DIAS-DA-SILVA, W. - Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de protease e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan* 51:107-115, 1989

- 47-HORST,J., HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - The active components of crotoxin - **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 46:1042-1047, 1972
- 48-HUNTER,W.M. & GREENWOOD, F.C. - Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity **Nature** 194:495-496, 1962
- 49-JENG, T.W., HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venom. **Proc.Natl.Acad.Sci. USA** 75:600-604, 1978
- 50-KANKONKAR, S.R., KANKONKAR, R.C., GAITONDE, B.B. & JOSHI, S.V. - Irradiated cobra (*Naja Naja*) venom for biomedical applications. In Radiosterilization of Medical Products. **Int. Atom.Energy Agency**, 1975
- 51-KOCHOLATY, W.F., GOETZ,C.S., ASHLEY, B.D., BILLINGS, T.A. & LEDFORD, E.B. - Immunogenic response of the venoms of Fer-de-Lance, *Botrops atrox asper*, la Cascabella, *Crotalus durissus durissus*, following photooxidative detoxification. **Toxicon**,5:153-158, 1968
- 52-KOUYOUUMDJIAN, J.A., HARRIS, J.B. & JOHNSON, M.A. - Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin - **Toxicon** 24:575-583, 1986
- 53-LAEMNLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970
- 54-LAUHATIRANANDA, P., GANTHAVORN,S. & HAYADOM,V. - Radiation effects on cobra venom In: International Atomic Energy Agency. Radiation Sensitivity of Toxins and Animal Poison, Bangkok, May 19-22, 1969 pp 107-112

- 55-LOMBA, M.G. - Estudos sobre distribuição e excreção de Crotoxina ¹³¹I em cães. Tese de Doutorado - Inst.Central de Biologia - UNICAMP - Campinas S.Paulo, 1969
- 56-LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin-phenol reagent *J.Biol.Chem.* 193:265-75, 1951
- 57-MAGALHÃES, R.A., RIBEIRO, M.M.F, REZENDE, N.A. & AMARAL, C.F.S. - Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*) *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo* 28:228-233, 1986
- 58-MARLAS, G. & BON, C. - Relationship between the Pharmacological Action of Crotoxin and its Phospholipase activity. - *Eur.J.Biochem.* 125:157-165, 1982
- 59-MOROZ, C., GOLDBLUM, N. & de VRIES, A. - Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethylcellulose bound neurotoxin as antigen. - *Nature*, 200:697-698, 1963
- 60-MUNIZ, Z.M., BEIRÃO, P.S. & DINIZ, C.R. - A simple method for radioiodination of crotoxin *Arq.Biol.Tecnol.* 31:(1) 164 J27, 1988
- 61-MURATA, Y. - Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988 (Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)
- 62-MURATA, Y., NISHIKAWA, A.K., NASCIMENTO, N., HIGASHI, H.G., SILVA, W.D., & ROGERO, J.R. - Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities In: International Society on Toxinology PanAmerican Section - III Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins. Mexico, 9-12 January 1990 - Mexico 1990 ,p 93

- 63-NAKAZONE, A.K., ROGERO, J.R. & GONÇALVES, J.M. - Crotoxin. I. Immunology and interaction of the subunits - *Braz.J.Med.Biol.Res.* **17**:119-128, 1984
- 64-NAYAR, G.N.A. & SRINIVASAN, S. - The effects of Gamma Irradiation on solutions of Acetylcholinesterase. *Radiation Res.* **65**:657-661, 1975
- 65-OKONOGLI, T., HATTORI, Z., OGISO, A. & MITSUI, S. - Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527, 1979
- 66-OUCHTERLONY, O. - Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog.Allergy* **5**:1-78, 1958
- 67-PRADO-FRANCESCHI, J. - Estudo sobre a convulxina. Tese Instituto de Biologia UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1970
- 68-PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O. - Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattle snake, *Crotalus durissus terrificus* - *Toxicon* **19**:875-887, 1981
- 69-PURANANANDA, C. - Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization - Vienna, International Atomic Energy Agency, 1972
- 70-RADVANYI, F., SALIOU, B., LAMBEZAT, M.P. & BON, C. - Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A2 neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. *J.Neurochem.* **53**:1989

- 71-FREYVELD, E.R., GIRARD, O., CHEYKOUA, M., ASSO, J. & DE KUDDEK, J. - Nouveau procédé d'inactivation pour la preparation de vaccins. In: *Developments in Biological Standardizations*, 27: S.Karger, Basel, pp236-348, 1974
- 72-RIBEIRO, L.A.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; ALBUQUERQUE, M.J. & TAKAOKA, N.Y. - Epidemiological and clinical aspects of accidents due to poisonous snakes in the State of São Paulo, Brazil, from 1986 to 1988. In: *International Society on Toxinology PanAmerican Section - III Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins*. Mexico, 9-12 January 1990 - Mexico 1990, p 86
- 73-ROGERO, J.P. - Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica hidrogênio-trício São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Química, USP)

74-RUBSAMEN, K., BREITHAUPT, H., & HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiederberg's Arch.Pharmacol.* **270**:274-88, 1971

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

76-SATO, S. & TAMIYA, T. - Iodination of erabutoxin b with diiodohistidine formation. *Biochem.J.* **68**:867-872, 1970

77-SCHEMBERG, S. - Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science* **129**:1361, 1959

- 78-SINGH, A. & SINGH, H. - Time scale and nature of radiation biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. **Prog.Biophys.Molec.Biol.** 39:69-107, 1982
- 79-SKALKA, M. & ANTONI, F. - Effect of radiation on the biological properties of proteins In Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. pp 1-13, 1970,ed. International Atomic Energy Agency.
- 80-SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT,H. - Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem.Inst.Butantan** 12:505-513, 1938
- 81-SOUZA FILHO, J.N. - Efeitos da radiação ionizante na crotoxina(Toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*):Estudos ao nível molecular São Paulo, 1988 (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares)
- 82-TAKEDA,A.K., BARBOSA,S.F.C., COSTA, L.M. & ADELINO, M.G.F. - Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular **Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo** 27:115-122, 1985
- 83-TEJASEN, P. & OTTOLENGHI,A. - The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. **Toxicon**, 8:225-33, 1970
- 84-TU, A.T., HOMMA, M., HONG,B. & TERRIL, J.B. - Neutralization of rattlesnake venom toxicities by various compounds. **Clin.Pharmacol.** 10:323-329
- 85-VITAL-BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. **Mem.Inst.Butantan** 33:991-992, 1966

- 86-VITAL-BRAZIL, O.- Neurotoxins from South American rattle snake venoms.
J.Formoson Med. Assoc. 71:394, 1972
- 87-VITAL-BRAZIL,O., EUGENIO, A.G.B. & LASZLO, G.M. - Origem da
paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciencia e Cultura* 25:1165-1169,
1973
- 88-VITAL-BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev.Ass.Med.Brasil.**
26:212-218, 1980
- 89-VOLWERK,J.J., PIETERSON,W.A. & de HAAS, G.H. - Histidine at the Active
Site of Phospholipase A2 - **Biochemistry 13:1446-1454**
- 90-WHO - Progress in Characterization of Venoms and Standardization of
antivenoms, WHO offset Publication No.58, Geneva, 1981