



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS
INDUZIDOS POR VENENO CROTÁLICO OU
CROTOXINA IRRADIADOS EM FONTE DE ^{60}Co**

REGINA APARECIDA DE PAULA

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

**Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero**

**São Paulo
1995**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

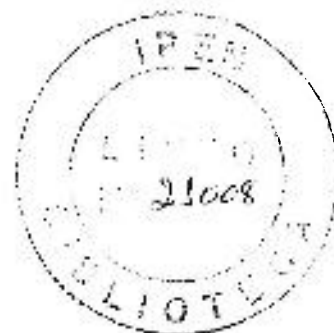
**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR
VENENO CROTÁLICO E CROTOXINA ISOLADA IRRADIADOS
EM FONTE DE ^{60}CO .**

REGINA APARECIDA DE PAULA

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

Orientador: Dr José Roberto Rogero

São Paulo
1995



Aos meus pais,

Pelo apoio incondicional que me permitiu chegar até aqui.

Ao Dr. José Roberto Rogero,

Pela orientação, confiança, incentivo e empenho dispensados.

Ao Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares,

Pela oportunidade de executar este trabalho.

Às pessoas da Coordenadoria de Bioengenharia (TB/IPEN),

Pela amizade e apoio técnico constantes.

Aos amigos do Grupo de Venenos,

Pelo companheirismo e colaboração.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.,

Pelas dicas e colaboração em diversas etapas deste trabalho.

A todos os Institutos e Pessoas,

Que participaram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Ao CNPq,

Pela bolsa concedida.

E especialmente a Nanci do Nascimento,

Cuja amizade, dedicação e apoio foram inestimáveis.

"OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR VENENO CROTÁLICO OU CROTOXINA IRRADIADOS EM FONTE DE ^{60}Co ."

REGINA APARECIDA DE PAULA

RESUMO: Acidentes com ofídios representam um grave problema de Saúde Pública em nosso país. Os acidentes com serpentes do gênero *Crotalus* são os mais severos. Por volta de 11% das vítimas morrem quando não recebem tratamento soroterápico. Os anti-soros são obtidos a partir do plasma de cavalos hiperimunizados com veneno bruto. O rebanho equino é pequeno, de manutenção dispendiosa, e durante a imunização, estes animais apresentam sinais de envenenamento que pode resultar em óbito. Estes fatos somados fazem com que a produção de anti-soros seja restrita. Várias técnicas que possibilitem reduzir a toxicidade dos venenos e toxinas e aumentar a soro produção têm sido desenvolvidas, utilizando agentes químicos e físicos. A radiação gama têm se mostrado excelente ferramenta, capaz de destoxicar venenos e toxinas em solução aquosa, sem o acréscimo de substâncias que possam atuar como imunógenos. As alterações mediadas pela irradiação resultam em diminuição dos efeitos tóxicos, sem a perda da imunogenicidade. Desta forma, é importante avaliar os anti-soros induzidos por toxinas irradiadas, verificar sua especificidade, seu potencial neutralizante e a utilização destes anti-soros em imunoenaios. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* e sua toxina mais potente, a crotoxina, foram irradiados com uma dose de 2.000Gy em fonte ^{60}Co , em solução aquosa e inoculados em coelhos, seguindo o método clássico de imunização. Os níveis séricos de anticorpos foram avaliados por imunodifusão radial dupla, ELISA e IRMA. A especificidade por imunoeletroforese, ELISA e *Western blotting*. O potencial neutralizante foi avaliado pela soroneutralização da atividade da fosfolipase A2 da crotoxina *in vitro*. Os anticorpos foram testados como reagentes em imunoenaios por ELISA e IRMA para detecção de antígenos em soro de camundongos inoculados experimentalmente com o veneno crotálico ou crotoxina. Os resultados mostraram que o veneno total e a crotoxina irradiados além de serem bons imunógenos, induziram a formação anticorpos capazes de reconhecer veneno ou toxina nativas. Estes soros se mostraram mais específicos e apresentaram alto potencial neutralizante quando comparado com anti-soro comercial. Com estes resultados concluiu-se que anticorpos, induzidos por veneno crotálico ou crotoxina irradiados, são reagentes altamente específicos, portanto poderiam ser utilizados em ensaios para diferenciar os acidentes crotálicos e botrópicos.

Resumo

“OBTAINMENT AND VALUATION OF ANTISERA RAISED AGAINST IRRADIATED CROTALIC WHOLE VENOM OR CROTOXIN IN ⁶⁰Co SOURCE.”

REGINA APARECIDA DE PAULA

ABSTRACT. Snake bite is a great Public Health problem in our country. The accidents with snakes from *Crotalus* genus are the most severe. About 11% of the victims die without serotherapy. The antivenoms are obtained from hyperimmune horse plasma. During the production, these animals present signs of envenoming that result in a decrease of organic resistance besides the horses maintenance is very expensive and the producers are fewer, so the sera production is restrict. Many techniques which could reduce the venoms toxicity and increase the sera production using chemical and physical agents have been studied. The gamma rays are excellent tool to detoxify venoms and toxins. It is able to modify protein structures that decrease letality, toxic and enzymatic activities without modifying the immunogenicity. So, it is important to evaluate the sera production in rabbits using gamma rays detoxified venom and crotoxin as immunogen and their power as reagents in immunoassays. In order to obtain the antisera, *Crotalus durissus terrificus* whole venom or isolated crotoxin was irradiated with 2.000 Gy in a ⁶⁰Co source, in a 150mM NaCl solution, and inoculated in rabbits. The sera production were screened by immunoprecipitation, immunoenzymatic (ELISA) and immunoradiometric (IRMA) assays. The specificity was studied by immunoelectrophoresis, ELISA and Western blot techniques. The neutralizing power was evaluated by neutralization of phospholipase A₂ activity of crotoxin *in vitro*. The antisera were used as reagents in antigen capture assays ELISA and IRMA immunoassays to detect circulant antigens in sera of mice experimentally inoculated with crotalic venom or crotoxin. The results showed that both detoxified venom or crotoxin were good immunogens, and they were able to inducie antibodies that could recognize non-irradiated venom or isolated crotoxin. The data suggest that those antibodies present more specificity and higher *in vitro* neutralizing power, when compaired with commercial anticrotalic antisera. So they could be used in immunoassays to distinguish crotalic and bothropic accidens.

SUMÁRIO:

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

GLOSSÁRIO

I	INTRODUÇÃO	1
II	OBJETIVOS	12
III	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1.	Preparo dos imunógenos	13
3.1.1.	Obtenção das amostras	13
3.1.2.	Dosagem de proteínas	13
3.1.3.	Irradiação das amostras	14
3.2.	Produção de anti-soros	15
3.2.3.	Hiperimunização de coelhos	15
3.3.	Avaliação dos anti-soros	20
3.3.1.	Detecção de anticorpos	20
3.3.1.1.	Detecção de anticorpos por Imunodifusão radial dupla (IRD)	20
3.3.1.2.	Detecção de anticorpos por ELISA	21
3.3.1.3.	Detecção de anticorpos por IRMA	23

3.3.2.	Especificidade dos anti-soros	25
3.3.2.1.	Imunorreatividade entre os anti-soros e o veneno crotálico por Imunoelektroforese	25
3.3.2.2.	Imunorreatividade entre os anti-soros e venenos de diferentes gêneros de serpentes por ELISA	27
3.3.2.3.	Imunorreatividade entre os anti-soros e venenos de diferentes gêneros de serpentes por <i>Western blot</i>	28
3.3.2.3.1	Preparo do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
3.3.2.3.2.	Transferência de proteínas do gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose	31
3.3.2.3.3.	Tratamento das membranas com os soros. Revelação por técnica imunoquímica	32
3.4.	Obtenção das imunoglobulinas	33
3.4.1.	Isolamento das IgGs a partir dos soros	33
3.4.2.	Avaliação da purificação das IgGs por SDS-PAGE	34
3.5.	IgGs purificadas: Avaliação do potencial neutralizante <i>in vitro</i>	36
3.6.	Aplicação dos soros. Detecção de antígenos circulantes	37
3.6.1.	Inoculação de toxinas em camundongos	38
3.6.2.	Detecção de antígenos circulantes por ELISA	38
3.6.3.	Detecção de antígenos circulantes por IRMA	39
IV	RESULTADOS	41
4.1.	Preparo de imunógenos	41

4.2.	Produção e detecção dos anti-soros	41
4.3.	Especificidade dos anti-soros	48
4.3.1.	Avaliação da especificidade dos anti-soros frente ao veneno crotálico por Imunoelektroforese	48
4.3.2.	Avaliação da especificidade dos anti-soros frente a venenos de diferentes gêneros de serpentes por <i>Western blot</i>	50
4.3.3.	Avaliação dos anti-soros frente a venenos de diferentes gêneros de serpentes por ELISA	58
4.4.	Isolamento das imunoglobulinas G (IgG)	62
4.5.	Avaliação da capacidade neutralizante da atividade da PLA₂ <i>in vitro</i>	64
4.6.	Detecção e quantificação do veneno total de <i>C. d. terrificus</i> e da crotoxina	67
V	DISCUSSÃO	75
VI	CONCLUSÕES	83
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXO I

GLOSSÁRIO:

EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DOS ENVENENAMENTOS:

Coma - Estado profundo de diminuição ou paralisação das reações intelectuais, sensitivas e motrizes, com perda da sensibilidade e da motilidade, causado por certas doenças graves, tais como diabetes e a uremia, por fortes traumatismos ou veneno.

Convulsões - Contração violenta e involuntária da musculatura, acompanhada de espasmos violentos.

Diplopia - Visão dupla.

Edema - Infiltração serosa do tecido conjuntivo, da pele ou de um órgão.

Fácies neurotóxica - Efeito sistêmico do veneno caracterizado pela paralisia flácida (debilidade) dos músculos faciais, somado à imobilidade da pálpebra superior unilateral ou bilateral, e paralisia dos músculos oculares, originando a incapacidade de movimentar o globo ocular.

IRA - Insuficiência renal aguda; do tipo hipercatabólica, devido à eliminação da mioglobina. Esta complicação pode também ser associada à necrose tubular.

Mialgia - Dores musculares generalizadas.

Midríase - Alterações no diâmetro pupilar devido a paralisia da íris.

Mioglobinúria - Eliminação da mioglobina pela via urinária.

Miólise - Ruptura das células musculares.

Mionecrose - Morte do tecido muscular esquelético, quando ainda fazendo parte do organismo vivo.

Oligúria - Alterações no volume urinário excretado.

Parestesia - desordem nervosa caracterizada por sensações anormais e alucinações sensoriais.

REAGENTES:

BSA - Albumina bovina de soro (Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.).

Conjugado 1 - IgG anti-IgG de coelho (molécula total) peroxidase (Sigma).

Conjugado 2 - IgG anti-IgG de cavalo (molécula total) peroxidase (Sigma).

DAB - 3,3-diaminobenzidina (Sigma).

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (Merck, Merck, Alemanha)

OPD - *Orto*-fenildiamina (Sigma).

PBS - Salina 150mM, tamponada com tampão fosfato, pH 7,2.

PLA₂ - Fosfolipase A₂, obtida a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Sigma).

SABC ou ABC - Soro antibotrópico comercial (Instituto Butantan, São Paulo, Brasil - lote: 9007133).

SACC ou ACC - Soro anticrotálico comercial (Instituto Butantan, lote: 8801012).

SACXI ou ACXI - Soro anticrotoxina irradiada, produzido em coelhos.

SACXN ou ACXN - Soro anticrotoxina nativa, produzido em coelhos.

SAVTI ou AVTI - Soro antiveneno crotálico irradiado, produzido em coelhos.

SDS - Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato (Sigma).

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (Sigma).

Tween 20® - Polioxil monolaurato sorbital (Sigma).

I. INTRODUÇÃO:

Acidentes com ofídeos, na maioria dos países situados em regiões tropicais e subtropicais, representam um grave problema de Saúde Pública. Estima-se que ocorram cerca de 500.000 acidentes anualmente no Mundo com aproximadamente 40.000 óbitos (BULL. W.H.O., 1981).

No Brasil, dos 20.000 casos notificados anualmente, cerca de 87,5% ocorrem com serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*. As serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* contribuem com 8,5%, 3,2% e 0,8% dos casos, respectivamente (JORGE & RIBEIRO, 1990; RIBEIRO, 1990).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (BULL. W.H.O., 1981) e Ministério de Saúde (Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993), os acidentes envolvendo serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascaveis, são os mais graves, sendo que 74% dos casos são moderados e severos e 11% das vítimas morrem na ausência de tratamento adequado. Este número decresce para 3,3% entre os pacientes que recebem tratamento com anti-soro específico (JORGE & RIBEIRO, 1992).

O veneno da *Crotalus durissus terrificus* caracteriza-se pela alta toxicidade, apresentando três atividades principais: neurotóxica, pela inibição da liberação de acetilcolina na placa motora; coagulante, onde ocorre afibrinogenia pela depleção do fibrinogênio, e, miotóxica sistêmica com ação preferencial sobre as fibras musculares tipo I, ricas em mioglobina (JORGE & RIBEIRO, 1992).

O quadro clínico apresentado pelo paciente caracteriza-se por efeitos locais discretos ou ausentes, onde pode haver dor de intensidade variável, edema e parestesia; efeitos sistêmicos neurotóxicos como a paralisia flácida, associada à diplopia e midríase, conhecidas como *fácies miastênica*; e efeitos gerais do envenenamento crotálico como miólise, mionecrose, mioglobinúria, oligúria, perturbações respiratórias e circulatórias, convulsões e coma (Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993). Estes efeitos podem conduzir à insuficiência renal aguda (IRA), que pode resultar em óbito (AZEVEDO-MARQUES *et al*, 1985). Isto se deve à ação dos vários componentes farmacologicamente ativos presentes no veneno crotálico, como a crotoxina, crotamina, convulxina, giroxina e delta-toxina (VITAL-BRAZIL, 1980).

A crotoxina, a principal toxina do veneno crotálico, corresponde de 60 a 65% de seu peso seco, sendo também a responsável pela elevada toxicidade do veneno. É uma proteína neurotóxica de peso molecular de 23.000 daltons. Sua ação fisiológica ocorre pelo bloqueio da transmissão neuromuscular principalmente em nível pré-sináptico, competindo pelos receptores de acetilcolina, e em altas concentrações pode ser observada ação em nível pós-sináptico (VITAL-BRAZIL, 1966; BON *et al*, 1979).

A crotoxina foi primeiramente isolada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT (1938) em estado cristalino, que a consideraram como uma proteína homogênea. FRAENKEL-CONRAT & SINGER (1956), tratando a crotoxina com fluorodinitrobenzeno, verificaram que ela era composta por duas subunidades. Utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica, alguns pesquisadores

conseguiram separar estas subunidades (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN *et al*, 1971).

A subunidade ácida, denominada crotapotina se mostrou desprovida das atividades enzimática e tóxica. Seu peso molecular foi avaliado em torno de 9.000 daltons. A crotapotina é composta por três cadeias polipeptídicas de 4.300, 3.700 e 1.600 daltons, interligadas por sete pontes dissulfídicas. A subunidade básica apresentou fraca atividade enzimática, do tipo fosfolipásica, sendo denominada fosfolipase A₂ (PLA₂). A PLA₂ apresenta cadeia única polipeptídica (RUBSAMEN *et al*, 1971; HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971), e seu peso molecular foi avaliado em torno de 14.000 daltons.

As duas subunidades da crotoxina estão fortemente associadas por ligação não covalente, na proporção molar 1:1 (ROGERO, 1978; NAKAZONE *et al*, 1984). Quando próxima ao alvo farmacológico as subunidades se dissociam, a fosfolipase liga-se aos sítios específicos presentes no nervo motor terminal e a crotapotina é liberada no meio (BON *et al*, 1979; BON *et al*, 1986; HAWGOOD, 1990). A crotapotina atua de forma sinérgica, conduzindo a fosfolipase ao alvo farmacológico, prevenindo ligações de baixa afinidade, e aumentando a eficiência farmacológica (BON *et al*, 1979).

Quando purificada por cromatografia de exclusão molecular de FPLC (alta pressão) e de troca iônica, verificou-se que a crotoxina pode ser uma mistura de várias proteínas, derivadas da combinação das isoformas das subunidades (FAURE & BON, 1987; FAURE & BON, 1988). FAURE & colaboradores (1994), verificaram que existem quatro variantes para cada subunidade, com estruturas moleculares e propriedades farmacológicas semelhantes, diferindo nas propriedades cromatográficas e mobilidade eletroforética, que combinadas são

conhecidas como isoformas da crotoxina (FAURE & BON, 1987; FAURE & BON, 1988). Utilizando técnicas de cDNA, FAURE *et al* (1994), verificaram que as isoformas da crotapotina são resultantes de diferenças pós-translacionais em uma única crotapotina precursora, e que as isoformas da fosfolipase são originadas a partir de diferentes clones.

A crotamina é uma proteína básica, neurotóxica e miotóxica, de peso molecular 4.880 daltons, presente em venenos de serpentes coletadas nas regiões Sudeste e Sul do Brasil e Argentina. A esta proteína é atribuída a mionecrose, e o aumento da contração da musculatura, devido a ativação dos canais de sódio presentes na membrana das fibras musculares (VITAL-BRAZIL, 1990).

A convulxina, neurotoxina de alto peso molecular, que varia de 60.000 a 72.000 daltons, provoca distúrbios no sistema nervoso autônomo, caracterizados pela salivação, perda de equilíbrio e convulsões. É responsável também pelas perturbações respiratórias e circulatórias (PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, 1981; PRADO-FRANCESCHI, 1990).

A giroxina, proteína neurotóxica de peso molecular variando de 33.000 a 34.000 daltons, apresenta as atividades trombina-símile e TAME-esterásica. Quando inoculada experimentalmente em camundongos, esta toxina provoca rotações ao longo do eixo longitudinal (BARRABIN *et al*, 1978; SEKI *et al*, 1980; PRADO-FRANCESCHI, 1990).

A delta-toxina é um componente pouco estudado, devido não ter sido devidamente isolado, ao qual é atribuído alterações sobre a permeabilidade vascular e o aumento nefrotoxicidade (VITAL-BRAZIL, 1980).

A utilização de anti-soros é a principal terapia disponível para o tratamento dos indivíduos picados por serpentes. É a ferramenta mais eficaz para combater os efeitos desastrosos ocasionados pelos venenos, desde que administrada a tempo, dose e via adequadas (CUPO *et al*, 1991). Os anti-soros consistem de uma solução rica em anticorpos antiveneno (F(ab')₂), concentrada e ampolada, obtida a partir do plasma tratado com pepsina, seguido de purificação por precipitação com sulfato de amônio (Manual de vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993).

Por ocasião do acidente, o tratamento consiste da administração do anti-soro antiveneno monoespecífico, que no caso de acidentes com cascavel é o anti-soro anticrotálico, por via endovenosa, o que irá garantir maior rapidez e eficiência na neutralização das toxinas circulantes (CUPO *et al*, 1991; RIBEIRO *et al*, 1993). O número de ampolas a ser administrado, em geral, é calculado de acordo com o quadro clínico desenvolvido, ou seja, de 10 a 20 ampolas para os casos leves e moderados e acima de 20 para os casos severos, que correspondem a volumes de anti-soro, por paciente, em torno de 100 mililitros, para os casos moderados, e acima de 200 mililitros, para os severos. Porém, quando a soroterapia é tardia ou a quantidade de anti-soro não é suficiente para neutralizar todo veneno circulante, as lesões e danos podem tornar-se irreversíveis, podendo resultar em óbito (TAKEDA *et al*, 1985; Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993; AZEVEDO-MARQUES *et al*, 1985).

Os venenos podem apresentar alto grau de similaridade antigênica, que pode ser observado pela alta taxa de imunoreatividade cruzada. Em acidentes envolvendo serpentes da mesma espécie, observou-se que alta variabilidade antigênica está relacionada a fatores como a idade, a região e o tipo de alimentação, que tornam o diagnóstico duvidoso, devido a disparidade dos sinais apresentados (HENEINE *et al*, 1990; OWNBY, 1990; MIDDLEBROOK, 1991; CHIPPAUX *et al*, 1991; LI & OWNBY, 1992; HENEINE & CATTY, 1993). Assim, em muitos casos, o soro polivalente é utilizado, sem a garantia da neutralização de todas as toxinas presentes no veneno (TAN *et al*, 1994).

Apesar das vantagens relatadas, a prática da soroterapia com soro heterólogo, somado a utilização de grandes volumes de substâncias exógenas, podem acarretar efeitos contrários como reações de hipersensibilidade (CUPO *et al*, 1991). Basicamente podem ocorrer as seguintes reações:

- reação anafilática (hipersensibilidade tipo I ou imediata), fenômenos imediatos e graves que ocorrem num período entre 5 a 60 minutos após a soroterapia, onde as substâncias exógenas reagem com a IgE circulante, que por sua vez reagem com receptores presentes em mastócitos e basófilos, ativando assim a liberação de substâncias farmacologicamente ativas como histamina, prostaglandina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, fator eosinófilo quimiotático e outras, células, provocando choque circulatório, convulsões e caso não tratado adequadamente óbito;
- doença do soro (hipersensibilidade tipo III ou tardia), que pode ocorrer 5 a 20 dias após a soroterapia, devido a formação de de complexos imunológicos circulantes inicia uma série de eventos que resultam em migração de leucócitos polimorfonucleares e reação inflamatória sistêmica, caracterizando por

apresentar mal-estar, febre, urticária, mialgia, náuseas, vômito e erupções generalizadas;

- pirogênica, que pode ocorrer logo após a soroterapia (CUPO *et al*, 1991; BARRAVIERA, 1994).

Estes efeitos podem ser evitados pelo teste de contato, ou pela administração prévia de anti-histamínicos (Manual de Vigilância Epidemiológica, IMESP, 1993; BARRAVIERA, 1994).

Os anti-soros são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se o veneno bruto como imunógeno, sem qualquer atenuação de suas atividades tóxicas. Os cavalos, pelo seu grande porte e seu potente sistema imune, permitem a coleta de grandes volumes de plasma rico em anticorpos antiveneno (em torno de dez litros de plasma anuais). Contudo, devido a alta toxicidade e letalidade do veneno crotálico, o montante de imunógeno inoculado é pequeno, aumentando o tempo de imunização (RIBEIRO *et al*, 1993). Estes fatos somados podem levar à limitação da soroprodução. Considerando-se que o rebanho eqüino destinado para esta finalidade é escasso, e que sua manutenção é onerosa, qualquer perda é econômica e clinicamente significativa (SJOSTROM *et al*, 1994).

Na década de 80, a produção de anti-soros, no Brasil, sofreu uma queda considerável. Este declínio foi resultado da suspensão da produção de imunobiológicos por laboratórios da rede privada em 1984. Desde então o Estado de São Paulo passou a controlar sua distribuição, criando-se Pontos Estratégicos para o atendimento de acidentes por animais peçonhentos e um sistema de notificação (RIBEIRO *et al*, 1993).

Em 1986, o Programa Nacional de Ofidismo, criado pelo Ministério da Saúde, comprou toda produção nacional, e responsabilizou-se pela distribuição às Secretarias Estaduais. As Secretarias, por sua vez, passaram a ser responsáveis pela distribuição em seus municípios e notificação dos acidentes ao Ministério, e os pacientes passaram a receber o tratamento gratuitamente, quando atendidos nos centros de atendimento credenciados (RIBEIRO *et al*, 1993).

Baseando-se nestes fatos, há a necessidade de se desenvolver técnicas que melhorem a produção de anti-soros capazes de neutralizar estas toxinas. Na bibliografia, podemos encontrar diferentes agentes, químicos e físicos, utilizados na tentativa de se conseguir um bom imunógeno com diferentes venenos.

FLOWERS (1963), obteve veneno de *Agkistrodon piscivorus* com as atividades fosfolipásica, necrosante e hemorrágica atenuadas após exposição à radiação X.

MOROZ *et al* (1963), observaram que a fração neurotóxica do veneno de *Vipera palestinae*, ligada a uma fase sólida de carboximetil-celulose, além de apresentar toxicidade reduzida, induziu a produção de anticorpos mais eficientes na neutralização da fração não acoplada. Porém, estes anticorpos foram ineficientes, quando testados contra o veneno bruto.

KOCHOLATY *et al* (1968), conseguiram anticorpos de alta capacidade neutralizante, a partir dos venenos de *Bothrops atrox asper* e *Crotalus durissus terrificus* destoxicados por foto-oxidação, na presença de azul de metileno.

TEJASEN *et al* (1970), verificaram que o veneno de *Agkistrodon piscivorus*, depois de exposto à luz ultravioleta, apresentava as atividades tóxica e enzimática reduzidas, e as propriedades imunológicas preservadas.

PURANANANDA (1972), utilizando radiação gama para esterilizar venenos de serpentes e toxinas isoladas, observou que após a irradiação os venenos e as toxinas apresentaram diminuição da toxicidade e mantiveram-se imunogênicos.

BARIDE *et al* (1980), procurando elucidar o mecanismo de destoxicação, compararam veneno tratado com formalina e veneno exposto à radiação gama. Os resultados mostraram que o veneno irradiado apresentou mudanças de carga e aumento dos grupos aromáticos expostos, fatos não observados para o veneno tratado com formalina.

COSTA *et al* (1985), comparando o veneno de *Crotalus durissus terrificus* tratado com formalina e veneno exposto ao calor, verificaram que a resposta imune dos animais foi melhor para o veneno tratado com formalina. Os animais imunizados com veneno exposto ao calor apresentaram baixos níveis séricos de anticorpos, sugerindo que este perdeu parte de sua imunogenicidade.

DANIEL *et al* (1987), incorporando iodo às toxinas do veneno crotálico, obtiveram atenuação de algumas atividades farmacológicas deste veneno. Todavia, quando a incorporação de iodo foi excessiva, observou-se perda da capacidade imunogênica destes venenos.

HIGASHI *et al* (1989), verificaram que as lesões nos locais de inóculo eram discretas ou ausentes nos cavalos imunizados com venenos botrópicos tratados com inibidores de centro enzimático e agentes quelantes.

GUIDOLIN *et al* (1989), trataram os venenos crotálico e botrópico com glutaraldeído, obtendo bom imunógeno a partir do veneno crotálico, porém obteve produto pouco imunogênico a partir do veneno botrópico.

HATI *et al* (1990) e MANDAL *et al* (1991 e 1993), mostraram que anti-soros produzidos em coelhos contra os venenos de *Vipera russelli* e *Naja naja*,

atenuados por dose de radiação gama de 1.000Gy, eram capazes de neutralizar as atividades letal, proteásica e fosfodiesterásica dos venenos nativos.

Dentre as metodologias citadas, observa-se que a radiação gama tem se mostrado capaz de atenuar os efeitos deletérios dos venenos, sem que aparentemente a capacidade imunogênica seja alterada. Um fato importante é que o material pode ser irradiado em solução aquosa, sem a adição de substâncias que possam atuar como imunógenos. MURATA (1988), NASCIMENTO (1991), GUARNIERI (1992) e SOUZA-FILHO (1992), mostraram que a exposição a uma dose de 2.000Gy de radiação gama é ideal para atenuação da toxicidade e manutenção da imunogenicidade dos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*.

A radiação gama é do tipo ionizante, e atua nas moléculas biológicas de duas formas: diretamente, onde ocorre a deposição da energia sobre as moléculas; e indiretamente, onde a energia é consumida no processo de radiólise da água, originando radicais e moléculas extremamente reativos ($\bullet\text{OH}$, e^- hidratado, $\bullet\text{H}$, H_2O_2) que interagem rapidamente com as macromoléculas (BUTLER *et al*, 1984). Tanto os efeitos diretos quanto os indiretos, provocam alterações moleculares estruturais em nível primário, secundário, terciário e quaternário (quebras, desdobramentos, agregamentos) que refletem em suas atividades biológicas (MURATA, 1988; NASCIMENTO, 1991; SOUZA-FILHO, 1992).

ANDRIANI (1995), irradiando a crotoxina na presença de substâncias (*scavengers*) que competem pelos radicais produzidos durante a radiólise da água, verificou que o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) está relacionado com a atenuação

da atividade enzimática, e o elétron hidratado (e^-_{aq}) com as alterações estruturais.

As vantagens apresentadas pela radiação gama na destoxicação de venenos, associada à necessidade de aprimorar a produção de anti-soros, e conseqüentemente melhorar o tratamento a ser oferecido aos pacientes, levou-nos a estudar o comportamento imunológico de anticorpos antiveneno, desenvolvidos em coelhos, induzidos pelo veneno total da cascavel *Crotalus durissus terrificus* e crotoxina isolada, destoxicados pela exposição à radiação gama em fonte de cobalto 60 (^{60}Co), a uma dose de 2.000 Gy.

II. OBJETIVOS:

O presente estudo, visa avaliar a produção de anticorpos, em coelhos, induzidos por veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* ou crotoxina isolada, atenuados por irradiação gama em fonte de cobalto 60 (^{60}Co) utilizando uma dose 2.000Gy, assim como verificar suas características positivas e negativas, e sua utilização como reagente em ensaios imunológicos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Preparo dos imunógenos.

3.1.1. Obtenção das amostras:

O "pool" de veneno de *Crotalus durissus terrificus* cristalizado, foi obtido no Instituto Butantan e mantido a -20°C .

A crotoxina foi isolada, a partir do veneno crotálico, conforme procedimento descrito por NASCIMENTO (1991), por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel Sephadex G-75 (4cm x 100cm) utilizando equipamento para cromatografia Pharmacia-LKB (Pharmacia, Suécia), numa primeira etapa e precipitação no seu ponto isoelétrico (pI 4,7), na segunda etapa. Após dialisada contra água, a crotoxina purificada foi liofilizada e mantida a -20°C .

3.1.2. Dosagem de proteínas:

Para a quantificação e padronização das concentrações proteicas usadas nos experimentos, foi utilizado o método colorimétrico, baseado no princípio *dye-binding*, conforme descrito por BRADFORD (1976).

A reação baseia-se na capacidade das proteínas interferir com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co, St. Louis, U.S.A.) em meio fortemente ácido, resultando em modificação de

cor proporcional ao montante proteico presente na solução, detectável a 595nm.

Os dados obtidos pela curva padrão de soroalbumina bovina (BSA Sigma; Sigma Chemical Co, USA) na concentração de 1mg/ml, em diluição seriada de 1:1 a 1:16, permitiram ajuste a uma função linear do tipo

$$Y = mx + B$$

onde x corresponde à concentração proteica, Y , à densidade óptica, m , ao coeficiente linear, B , ao ponto onde o eixo x intercepta o eixo y , com coeficiente de correlação r de valor próximo ao módulo de 1,0.

Para a reação, adicionou-se 3ml de reagente de Bradford (ácido fosfórico 5%, etanol 10% e Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1%, em água) e 100 μ l das amostras e padrões diluídos em salina (NaCl 150mM). Depois de homogenizadas, a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (Carl Zeiss PM.Q-II, Alemanha) a 595nm. A solução salina acrescida do reagente foi utilizada como controle negativo.

3.1.3. Irradiação das amostras:

Foram dissolvidos 50mg de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* (VTN) ou crotoxina isolada (CXN) 10ml de solução salina (NaCl 150mM) e centrifugadas a 5.000rpm (rotações por minuto) durante 15min à 4°C em centrífuga refrigerada (Sorvall RC2-B, Sorvall, USA). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e a concentração proteica ajustada a 2mg/ml. As amostras foram distribuídas em frascos de vidro (6ml/frasco) e mantidos a 4°C.

Posteriormente, as amostras de veneno total e fração isolada foram irradiadas, de forma homogênea, por exposição à radiação gama em fonte de Cobalto 60 (^{60}Co) (Gammacell 220, Atomic Energy Commission of Canada Ltda, Canadá), na presença de oxigênio, a uma dose de 2.000Gy (MURATA, 1988; NASCIMENTO, 1991; SOUZA-FILHO, 1992) e taxa de dose 631 ± 7 Gy/h, em frasco de vidro. Para controle, mantiveram-se, nas mesmas condições, fora da câmara de irradiação, amostras do veneno total e da crotoxina.

3.2. Produção de anti-soros.

3.2.1. Hiperimunização de coelhos:

A produção de anticorpos, tanto para uso em laboratório, quanto para soroterapia, foi feita por injeções repetidas de preparação do antígeno específico em animais. O sistema imunológico destes animais foi ativado, e os anticorpos produzidos liberados na corrente sanguínea. Estes animais foram sangrados e seus soros, ricos em anticorpos, foram devidamente tratados.

Utilizou-se 8 coelhos por grupo (tabela II), fêmeas, *Nova Zelândia*, adultas, pesando entre 2,8 a 3,0 kg, mantidos em gaiolas, com ração comercial, verduras e água *ad libitum* no biotério do IPEN, Supervisão Radiobiologia (TB).

O processo de imunização dos coelhos foi realizado durante aproximadamente um ano. Os imunógenos foram dissolvidos em adjuvantes, na proporção de 1:1, para estimular a resposta imune, segundo o método clássico, e aplicados conforme protocolo descrito por NASCIMENTO (1991). A quantidade de imunógeno administrada aos animais foi baseada nas doses obtidas em ensaios de atividade tóxica, ou dose letal 50% de uma população de camundongos (DL_{50}), determinadas por MURATA (1988) para o veneno total nativo e irradiado, e por NASCIMENTO (1991) para a crotoxina nativa e irradiada, com o mesmo "pool" de veneno utilizado nos experimentos. Estes valores foram calculados segundo Spearman-karber, conforme procedimento sugerido pela Organização Mundial de Saúde (BULL W.H.O., 1981) (anexo 1) e encontram-se relacionados na tabela I.

O protocolo de imunização está descrito na tabela III. As amostras nativas e/ou irradiadas foram diluídas em salina tamponada com tampão fosfato 150mM pH 7,2 (PBS), acrescido dos adjuvantes Freund completo (Difco, USA), Freund incompleto (Difco, USA) e hidróxido de alumínio (Aldrox, Brasil), nos três primeiros inóculos respectivamente (NASCIMENTO, 1991), na proporção de 1:1. Os demais inóculos foram realizados com as amostras diluídas em PBS.

As sangrias exploratórias foram realizadas quinzenalmente após o terceiro inóculo pela via intravenosa, e na sangria final por via cardíaca.

A obtenção de soro, a partir do sangue coletado, ocorreu da seguinte forma: o sangue foi distribuído em tubos de vidro, fundo cônico e mantidos durante 30min à 37°C. Depois de 15min à 4°C, o sangue foi centrifugado durante 10min à 1.500rpm em centrífuga refrigerada (Fanen Spin-II, Fanen,

Brasil). O sobrenadante (soro) foi transferido para tubos do tipo Eppendorf e o *pellet* foi descartado. Os soros foram armazenados à -20°C para estudos posteriores.

Tabela I: Valores da dose letal 50%, em uma população de camundongos (DL₅₀), das toxinas utilizadas como imunógenos.

Imunógenos (Ag)	DL ₅₀ i.p. em camundongos (µg/kg)*
Crotoxina nativa (CXN)	79 ± 6
Crotoxina irradiada (CXI)	268 ± 35
Veneno total nativo (VTN)	200 ± 38
Veneno total irradiado (VTI)	942 ± 20

*O cálculo da DL₅₀ foi realizado conforme protocolo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (anexo I).

Tabela II: Identificação dos coelhos e seus respectivos imunógenos.

Imunógenos (Ag)	Coelhos imunizados	
	grupo 1	grupo 2
CXN	1, 2, 3, 4	I, II, III, IV
VTI	5, 6	-
CXI	7, 8	V, VI, VII, VIII

Imunógenos: CXN, Crotoxina nativa; VTI, veneno total irradiado; CXI, crotoxina irradiada. Nº de animais por grupo: 8.

Tabela III: Protocolo do esquema de imunização de coelhos.

Tempo (semanas)	Dose inoculada (DL ₅₀)	Volume (ml)	Via	Adjuvante
1	2,0	2,0	id	F.C.
3	2,0	2,0	id	F.I.
5	2,0	2,0	id	Al(OH) ₃
8	2,0	2,0	sc	PBS
9 (reforço)	6,0	2,0	sc	PBS
11(desafio)	10,0	2,0	sc	PBS
13(desafio)	16,0	2,0	sc	PBS
Descanso: 120 dias.				
1 ^o dia	2,0	2,0	sc	PBS
15 ^o dia	2,0	2,0	sc	PBS
30 ^o dia	50µg/animal	0,2	ev	PBS

Vias de administração de imunógenos: ev, endovenosa; id, intradérmica; sc, subcutânea

Adjuvantes: F.C., Freund completo (Difco, USA); F.I., Freund incompleto (Difco, USA); PBS, tampão fosfato salina 150mM (pH 7,2); Al(OH)₃, hidróxido de alumínio

Descanso: Durante a imunização, os animais permaneceram 120 dias sem receber estímulos, com o intuito de verificar quanto tempo os anticorpos persistiam circulantes.

3.3. Avaliação dos anti-soros produzidos em coelhos.

3.3.1. Detecção de anticorpos:

Para acompanhar o desenvolvimento de anticorpos antiveneno ao longo do processo de imunização, foram aplicadas três técnicas imunológicas: a imunoprecipitação (imunodifusão radial dupla), para triagem inicial e verificação da identidade destes anticorpos frente ao antígeno; e os ensaios imunoenzimático (ELISA) e imunorradiométrico (IRMA), para análise qualitativa e quantitativa dos anticorpos.

3.3.1.1. Titulação exploratória pela técnica de Imunodifusão radial dupla (IRD):

Os níveis séricos de anticorpos nas primeiras sangrias, foram avaliados pelo método semi-quantitativo de imunodifusão radial dupla em gel de ágar (OUCHTERLONY, 1958).

Esta é uma técnica direta e simples, que permite verificar a identidade entre antígeno e anticorpo, pelo padrão de linhas de precipitação formadas pelo complexo antígeno-anticorpo, em um meio semi-sólido como o gel de ágar.

As lâminas de microscopia (27 X 65mm) foram recobertas com 1ml de ágar a 2% em água. Depois de secas a 37^oC, as lâminas receberam 3ml de ágar 2% em solução salina (NaCl 150mM). Após solidificação do gel, foram

feitos sete orifícios, sendo um central e seis adjacentes, a uma distância de 25mm entre eles.

O orifício central recebeu 5µg/10µl de veneno total nativo em salina e os adjacentes 10µl dos soros em diluição seriada, de 1:1 a 1:512 em salina. Os ensaios foram feitos em duplicata, tendo como controles o soro do animal não imunizado e o tampão. Após um período de incubação, 48h em câmara úmida e à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com salina e água destilada, e secas a 37°C.

As linhas de precipitação formadas foram reveladas por imersão das lâminas em solução corante (Coomassie Brilliant Blue 250-R 0,12% em solução metanol 40% e ácido acético glacial 7% em água) durante 15min.

O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas em solução descorante (metanol 40% e ácido acético glacial 7% em água). Depois de secas, as lâminas foram armazenadas envoltas em papel vegetal, em local fresco.

Os resultados foram expressos na diluição máxima, onde as linhas de precipitação podiam ser visualizadas.

3.3.1.2. Titulação pela técnica imunoenzimática (ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay):

A avaliação qualitativa e quantitativa dos anticorpos antiveneno, foi realizada utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA, conforme metodologia

descrita por THEAKSTON *et al* (1977), para detecção de anticorpos antiveneno.

Esta é uma técnica relativamente simples, de alta sensibilidade e reprodutibilidade, que permite a detecção direta de anticorpos presentes na amostra. Nesta técnica, o antígeno (Ag) adsorvido em fase sólida (polivinil ou poliestireno) irá reagir com os anticorpos (Ac) presentes na amostra. O complexo formado é revelado por reação com um segundo anticorpo conjugado a uma enzima, dirigido contra o primeiro Ac, que na presença do substrato específico resultará em alterações de cor, proporcionais ao montante de anticorpos presente na amostra, que podem ser medidas em espectrofotômetro.

Placas de microtitulação (Hemobag, Campinas, Brasil) foram preenchidas com 100µl/poço de veneno total diluído em tampão carbonato de sódio 50mM (pH 9,6) a uma concentração de 10µg/ml durante 16 a 18h à 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas quatro vezes com salina tamponada com tampão fosfato 150mM (pH 7,2), contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) (PBST).

Os espaços sem antígeno adsorvido dos poços foram preenchidos com 200µl de soroalbumina bovina (BSA) a 1%, em PBST, durante 1h a 37°C. Depois da lavagem das placas, 100µl dos soros dos coelhos obtidos durante a imunização e da sangria final, diluídos de 1:100 a 1:10.000.000 em PBST foram incubados durante 30min a 37°C. Após nova lavagem, as placas receberam 100µl/poço do segundo anticorpo conjugado com peroxidase (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cavalo), diluído a 1:2000 em PBST por 30 min a 37°C.

Para revelar a reação, foram adicionados 100µl/poço de solução substrato cromógeno *orto*-fenildiamina (OPD) a 0,02%, contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,002% em tampão citrato de sódio 50mM (pH 5,0). Após 20min em câmara escura, a reação foi finalizada pela adição de 50µl/poço de solução ácido cítrico 200mM. A densidade óptica (DO) determinada a 450nm em leitora de ELISA (espectrofotômetro Multiscan Dynatech MR-5000, Finlândia).

Os ensaios foram feitos em duplicata. O soro de coelho não imunizado, soro de cavalo não imunizado, soro anticrotálico comercial e tampão foram utilizados como controle. Os resultados foram considerados positivos quando, na diluição máxima dos soros, a DO apresentou valores acima de 0,090.

3.3.1.3. Titulação pela técnica imunorradiométrico (IRMA - Immunoradiometric assay):

O ensaio imunorradiométrico (IRMA), é uma técnica direta, simples e reprodutível, cujo princípio está baseado na utilização de anticorpos em excesso, conforme descrita inicialmente por MILES & HALES (1968), e modificada para detecção de anticorpos, tendo como exemplo o protocolo descrito por ANICETTI *et al* (1986). Esta técnica foi utilizada para a avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos antiveneno dos soros da sangria final.

Para a detecção de anticorpos, o antígeno é adsorvido à fase sólida, depois de reação com anticorpos presentes na amostra, o complexo antígeno-anticorpo formado é revelado utilizando um segundo anticorpo marcado com radioisótopo (dirigido contra o primeiro anticorpo), ou ainda,

utilizando um traçador universal como a Proteína A radioiodada. A radioatividade da fase sólida é proporcional ao montante de traçador ligado ao anticorpo, e portanto proporcional ao conteúdo de complexo antígeno-anticorpo presente na amostra.

A Proteína A é uma proteína de peso molecular 42.000 daltons, presente na parede celular da maioria das linhagens da bactéria *Staphylococcus aureus*. Sua principal característica é sua alta afinidade pela cadeia pesada da região constante (Fc), de algumas subclasses de imunoglobulina G. Utilizada como traçador, apresenta como vantagem a baixa afinidade com a fase sólida plástica utilizada, dispensando a etapa de bloqueio, sem interferir com a capacidade de ligação do anticorpo pelo antígeno (HARLOW & LANE, 1988).

O procedimento adotado nesta técnica para a detecção de anticorpos foi realizado de forma semelhante ao descrito para o ELISA (item 3.3.1.2.), nas etapas que compreendem adsorção do antígeno seguida de incubação com os soros diluídos, com exceção à etapa de saturação dos poços com BSA, que foi dispensada.

Após o procedimento de lavagem, a reação foi revelada por incubação durante 1h, em temperatura ambiente, com Proteína A radioiodada (doada por Ribella, M.T. e colaboradores da Supervisão Radioensaios - TB/TBM/IPEN) contendo 30.000cpm/100µl em PBST, em substituição ao segundo anticorpo marcado.

Depois de lavados com PBST, os poços foram secos, cortados e distribuídos em tubos de polipropileno (12cmX10mm) devidamente

identificados. A radioatividade de cada poço foi determinada em contador gama (contador gama multipoço Oakfield 12-C, Inglaterra) durante 1min.

Esta metodologia foi utilizada na detecção dos anticorpos presentes nos soros da sangria final. Os ensaios foram feitos em duplicata. O soro de coelho não imunizado, soro de cavalo não imunizado, soro anticrotálico comercial e tampão foram utilizados como controle. Os resultados foram considerados positivos quando, na diluição máxima dos soros, o percentual de radioatividade, correspondente ao traçador ligado na fase sólida, foi acima de 3%.

3.3.2. Especificidade dos anti-soros.

A avaliação da especificidade, ou seja, a capacidade dos anticorpos antiveneno em reagir com toxinas nativas, de venenos homólogos (*C. d. terrificus*) e/ou heterólogos (venenos botrópicos, laquéticos e elapídico), foi realizada utilizando a técnica de imunoeletroforese, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a técnica de imunotransferência (*Western blot*).

3.3.2.1. Imunorreatividade entre os soros e o veneno crotálico por imunoeletroforese:

A capacidade dos anticorpos de reconhecer o veneno crotálico nativo foi avaliada pela técnica de imunoeletroforese. Esta técnica foi descrita por

GRABAR *et al* (1953), e consiste na combinação das técnicas de separação eletroforética e imunoprecipitação de proteínas.

As proteínas do antígeno são separadas sob influência de corrente elétrica em meio semi-sólido como o gel de agarose. Em seguida, as bandas separadas são expostas ao anticorpo, formando linhas de precipitação entre o complexo antígeno-anticorpo formado. O complexo antígeno-anticorpo é revelado por coloração e a avaliação é feita por comparação entre os padrões de bandas reconhecidas pelos diferentes anticorpos.

Este ensaio foi realizado em placas de vidro 12cm x 10cm, que receberam 12ml de agarose 1% em tampão barbital sódico 4mM (pH 8,6). Após solidificação do gel, foram feitos 5 orifícios a uma distância de 3cm na porção central da placa e quatro canaletas de 3mm x 5cm foram escavadas entre eles.

Os orifícios receberam 5 μ g/10 μ l de veneno total nativo (VTN), em solução salina (NaCl 150mM). A separação das proteínas foi realizada em aparato para imonoeletroforese (Pharmacia-LKB, Suécia), sistema semi-seco, e a migração ocorreu sob corrente de 60mA e voltagem máxima de 200V, durante 1h.

Após a separação eletroforética das proteínas do veneno, as placas de vidro foram colocadas em placas de Petri e cada canaleta recebeu, separadamente, 100 μ l das amostras dos anti-soros anti-VTI, anti-CXN e anti-CXI diluídos a 1:10 em salina. Depois de 48h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com salina e água, e secas a 37°C.

Em seguida, as placas foram imersas em solução corante (Coomassie) durante 15min, e as linhas de precipitação formadas foram evidenciadas por

lavagens sucessivas em solução descorante. Depois de secas, as placas foram envoltas em papel vegetal e mantidas em local fresco.

O ensaio foi realizado em duplicata e como controle foram utilizados o soro de coelho normal, soro anticrotálico comercial, e o tampão.

3.3.2.2. Imunorreatividade entre os soros frente a venenos heterólogos, de diferentes gêneros e espécies de serpentes, por ELISA:

Nesta técnica, os soros foram testados em diluição seriada (de 1:1.000 a 1:1.000.000) frente a diferentes venenos, com o intuito de verificar se os anticorpos produzidos eram capazes de reagir com venenos de diferentes gêneros e espécies de serpentes.

Placas de microtitulação foram preenchidas com 100µl dos seguintes venenos brutos: *Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cumanensis*, *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuweidi*, *Micrurus frontalis* e *Lachesis muta* dissolvidos a 10µg/ml em tampão carbonato de sódio 50mM pH 9,6, durante 16 a 18h à 4°C. As demais etapas, desde o preenchimento dos espaços vazios com BSA à revelação com a solução de substrato cromógeno OPD, prosseguiram conforme descrito para o ELISA no item 3.3.1.2..

Os ensaios foram feitos em duplicata, tendo como controles os soros anticrotálico e antibotrópico, o soro de coelho e de cavalo não imunizados, e a solução tampão.

3.3.2.3. Imunorreatividade entre os soros frente a venenos heterólogos, de diferentes gêneros e espécies de serpentes, por *Western blotting*:

Com o intuito de verificar quais frações dos venenos de serpentes, dos diferentes gêneros e espécies, foram capazes de reagir com os soros, foi aplicada a técnica de *Western blotting* (WB).

Esta técnica, descrita por TOWBIN *et al* (1979), consiste na combinação das técnicas de separação de proteínas em gel de poliacrilamida ou de agarose, por difusão sob influência de corrente elétrica, seguido de transferência das proteínas separadas no gel para membrana de nitrocelulose, na presença ou não de corrente elétrica. Em seguida, a membrana é recoberta com o soro devidamente diluído. A reação antígeno-anticorpo pode ser detectada por segundo anticorpo marcado, dirigido contra o primeiro anticorpo. A revelação é feita por técnicas imunoquímicas.

3.3.2.3.1. Preparo do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Para a separação dos componentes dos venenos, exclusivamente por peso molecular, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sistema desnaturante não reduzido, segundo LAEMMLI (1970), utilizando gel de corrida a 15% e gel de empilhamento a 3,5% (tabela IV).

Os venenos de *Crotalus durissus terrificus*, *C.d. cumanensis*, *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *Micrurus frontalis* e *Lachesis muta*, a 2mg/ml em salina, foram dissolvidos em

tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1% e glicerol 20%, em tampão de empilhamento) atingindo a concentração de 60 μ g/100 μ l e mantidos em banho-maria 100 $^{\circ}$ C durante 5min.

Cada poço isolado do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) recebeu 45 μ l de cada veneno. As proteínas foram separadas por migração sob corrente elétrica de 20mA e voltagem máxima de 200V durante 4 a 5h, em aparato eletroferético (Pharmacia-LKB, Suécia) contendo tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 192mM e 1% de SDS, em água). Para acompanhar a migração das proteínas, foi utilizado, o marcador azul de bromofenol.

A estimativa do peso molecular foi realizada por comparação entre o perfil de cada veneno, com perfil mistura de baixo peso molecular (Dalton Mark VII-L, Sigma Chemical Co, USA; tabela V) utilizado na concentração de 90 μ g/100 μ l.

Tabela IV: Soluções e reagentes utilizados no preparo do gel de poliacrilamida.

Soluções	Resolução (gel a 15%)	Empilhamento (gel a 3,5%)
Solução A/B	15 ml	1,2 ml
Tampão resolução	7,5 ml	-
Tampão empilhamento	-	2,5 ml
Água destilada	7,5 ml	6,3 ml
Solução PS	0,150 ml	0,150 ml
TEMED	0,020 ml	0,010 ml

Reagentes: Solução A/B, Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%, em água destilada; Tampão de resolução, Tris/HCl 1,5M pH 8,8 contendo 1% de SDS; Tampão de empilhamento, Tris/HCl 750mM pH 6,8 contendo 1% de SDS; Solução PS, persulfato de amônio a 10%, em água destilada; SDS, dodecil sulfato de sódio (Sigma Chemical Co, USA); TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenediamida (Sigma Chemical Co, USA)

Tabela V: Composição do padrão Dalton Mark VII-L (Sigma Chemical Co, USA):

Proteína	Peso Molecular (daltons)
Albumina bovina	66.000
Ovoalbumina	45.000
Dehidrogenase fosfato-3-gliceraldeído	39.000
Anidrase carbônica	29.000
Tripsinogênio	24.000
Inibidor de tripsina	20.100
α -Lactoalbumina	14.200

3.3.2.3.2. Transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose.

Após a migração, o gel (8,5 x 14,5cm) foi retirado do aparato eletroforético e imerso em solução fixadora (metanol 40% e ácido acético glacial 10% em água) durante 30 min. Em seguida o gel foi lavado em tampão de transferência, e colocado sobre a membrana de nitrocelulose, de mesmo tamanho do gel, na seguinte disposição:

- eletrodo de grafite polo positivo,
- 6 a 8 folhas de papel de filtro 3MM (Pharmacia, Suécia) umedecido em tampão de transferência (Tris 50mM, glicina 750mM, metanol a 20%, SDS a 0,37%, em água),
- a membrana de nitrocelulose poro 45µl (Sigma Chemical Co, USA), imersa durante 2 a 4h em tampão de transferência,
- o gel SDS-PAGE,
- folhas de papel de filtro 3MM umedecidas em tampão de transferência,
- o eletrodo de grafite polo negativo.

As proteínas foram transferidas, em sistema semi-seco (TOWBIN *et al*, 1979), utilizando aparato para transferência (Immunoblot, Sigma Chemical Co, USA; fonte Pharmacia-LKB, Suécia), durante 1h sob corrente de 80mA e voltagem máxima de 10V.

Depois da transferência, para averiguar se todas as proteínas foram para a membrana de nitrocelulose, o gel foi imerso em solução corante (Coomassie) durante à noite e descorado por lavagens sucessivas em solução descorante (metanol/ácido acético glacial).

3.3.2.3.3. Tratamento das membranas com os soros. Revelação por técnica imunológica.

As membranas de nitrocelulose foram lavadas 6 vezes com 50ml de tampão fosfato salina 150mM pH 7,2 (PBS), sob agitação, durante 5min. Os espaços vazios foram preenchidos por 5% de leite com baixo teor calórico, diluído em PBS durante 1h (50ml). Depois de lavadas, as membranas foram incubadas, separadamente, durante a noite, à 4°C, com os soros antiveneno total irradiado, anticrotóxina nativa e anticrotóxina irradiada, tendo como controle soro anticrotálico comercial (Instituto Butantan, São Paulo), diluídos a 1:100 em PBS (50ml/membrana).

As membranas foram lavadas e incubadas com o 2º anticorpo conjugado com peroxidase adequado (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cavalo) diluído a 1:1000 em PBS (50ml/membrana), durante 1h em temperatura ambiente, sob agitação.

Depois de lavadas 3 vezes com 50ml de PBST e 3 vezes com 50ml de PBS, cada membrana foi imersa, separadamente, em 50ml de solução contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) 0,03% e peróxido de hidrogênio a 0,2%, na presença de 0,2% de cloreto de cobalto, em PBS (substrato cromógeno), sob agitação durante o tempo suficiente para a visualização das bandas (sem formação de coloração de fundo). O excesso de corante foi retirado por lavagem com PBS e água.

As membranas foram secas e acondicionadas entre folhas de papel de filtro, em plástico aderente e mantidas em local fresco e protegidas da luz.

Os geis SDS-PAGE e as membranas tratadas foram submetidas a Scanjet II cx (Hewlett Packard, E.U.A.).

3.4. Obtenção das imunoglobulinas.

3.4.1. Isolamento das IgGs à partir dos soros:

Para o isolamento das imunoglobulinas G (IgG), a partir do soro total ou plasma, foram utilizadas duas técnicas: a precipitação com sulfato de amônio, segundo protocolo descrito por PEROSA *et al* (1990), seguido de cromatografia por afinidade em coluna contendo gel de Proteína A-Sepharose (Pharmacia), segundo protocolo descrito por YARMUCH *et al* (1992).

Para cada 1ml de soro, foram adicionados gota a gota, sob agitação, 1ml de solução saturada de sulfato de amônio a 80%, tampão fosfato 50mM (pH 7,0), de modo que a concentração final de sulfato de amônio fosse 40%. Após 3h sob agitação, em banho de gelo, a mistura foi centrifugada durante 5 min à 10.000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em solução sulfato de amônio 1,5M (pH 7,0), seguido de centrifugação conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi ressuspenso em solução salina, dialisado durante 24h contra água destilada, dialisado 12h contra salina, e liofilizado.

As IgGs parcialmente purificadas, diluídas a 2mg/ml em PBS foram cromatografadas em coluna de afinidade Proteína A-Sepharose (1,5ml de gel), pré-lavada com PBS. As proteínas não adsorvidas foram retiradas por lavagem com PBS. As IgGs foram eluídas em tampão Tris-HCl 100mM pH 2,8, em frações de 0,5ml que foram coletadas em tubos contendo 0,1ml de tampão Tris-HCl 250mM pH 8,8, para evitar desnaturação da IgG.

As IgGs isoladas e purificadas foram dialisadas contra PBS e mantidas a -20°C, para testes posteriores.

3.4.2. Avaliação da purificação das IgGs por SDS-PAGE:

O processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sistema desnaturante não reduzido, utilizando gel de resolução a 7% e gel de empilhamento a 3,5% (tabela VI), segundo LAEMMLI (1970), em aparato de eletroforese (Pharmacia LKB, Suécia).

As diferentes amostras de IgGs isoladas, a 2mg/ml em PBS, foram dissolvidas em tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1% e glicerol 20%, em tampão de empilhamento) atingindo a concentração de 60µg/100µl e mantidas em banho-maria 100°C durante 5min.

Cada poço do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) recebeu 45µl de amostra, e depois de submetidas à corrente elétrica de 20mA durante 1,5 a 2 horas, em aparato eletroferético (Pharmacia-LKB, Suécia) contendo tampão de corrida (Tris 50mM, Glicina 75mM e 1% de SDS, em água), o gel foi corado por imersão em corante Coomassie, conforme descrito no item **3.3.2.3.1..**

Para acompanhar a migração das proteínas, foi utilizado, o marcador azul de bromofenol. A estimativa do peso molecular foi realizada por comparação aos padrões de alto peso molecular (Sigma; tabela VII), a uma concentração de 90µg/100µl.

Tabela VI: Soluções e reagentes utilizados no preparo do gel de poliacrilamida.

Soluções	Resolução (gel a 7%)	Empilhamento (gel a 3,5%)
Solução A/B	7,2 ml	1,2 ml
Tampão resolução	7,5 ml	-
Tampão empilhamento	-	2,5 ml
Água destilada	15,3 ml	6,3 ml
Solução PS	0,150 ml	0,050 ml
TEMED	0,030 ml	0,010 ml

Reagentes: Solução A/B, Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%, em água destilada; Tampão de resolução, Tris/HCl 1,5M pH 8,8 contendo 1% de SDS; Tampão de empilhamento, Tris/HCl 750mM pH 6,8 contendo 1% de SDS; Solução PS, persulfato de amônio a 10%, em água destilada; SDS, dodecil sulfato de sódio (Sigma Chemical Co, USA); TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenediamida (Sigma Chemical Co, USA)

Tabela VII: Composição da solução padrão de alto peso molecular (Sigma Chemical Co, USA):

Proteínas	Peso Molecular (daltons)
Miosina	205.000
β-Galactose	116.000
Fosforilase B	97.400
Soroalbumina bovina (BSA)	66.000

3.5. IgGs purificadas: avaliação do potencial neutralizante *in vitro*:

A metodologia de neutralização da atividade enzimática da fosfolipase A_2 *in vitro*, descrita por GUTIÉRREZ *et al* (1989), foi utilizada para avaliação da capacidade neutralizante das IgGs de coelho isoladas. A principal vantagem desta técnica é avaliar *in vitro*, a eficácia dos soros produzidos ao longo do processo de imunização, em resultados correspondentes aos valores encontrados em experimentos *in vivo*.

O princípio desta técnica, desenvolvida em meio semi-sólido como a agarose, está baseado na capacidade da fosfolipase reagir com a lecitina da gema de ovo, resultando em lisolecitina, que irá provocar ruptura das hemácias presentes no gel.

Numa primeira etapa, 0,6 μ g/10 μ l de crotoxina e diferentes concentrações das imunoglobulinas (ACXN, ACXI, AVTI e ACC), de 0,5 a 60 μ g/40 μ l, para um volume final de 50 μ l, foram incubados durante 30min à 37°C. Todos os reagentes foram diluídos em PBS.

Na segunda etapa, placas de vidro 12cm x 10cm receberam 12ml de gel agarose/gema de ovo/hemácias (agarose 0,8%, gema de ovo 0,5% e papa de hemácias a uma quantidade suficiente para que o hematócrito da solução fosse 5%, em PBS).

Após a solidificação do gel, foram escavados nove orifícios a uma distância de 2,5cm entre eles. Cada orifício recebeu 10 μ l das soluções crotoxina acrescida das IgGs, previamente incubadas, separadamente. Todas as placas tiveram como controle a crotoxina, a fosfolipase de *C. d. terrificus* comercial (Sigma Chemical Co, USA) e o tampão PBS.

Após incubação em câmara úmida durante 20h à 37°C, os halos de hemólise formados, proporcionais à ação da fosfolipase A₂ presente na crotoxina não neutralizada pelo anticorpo, foram medidos e os valores encontrados, colocados em gráfico.

3.6. Aplicação dos soros. Detecção de antígenos circulantes:

A detecção e o estudo do veneno total e da crotoxina isolada, em soro de camundongos inoculados experimentalmente com estes antígenos, foram realizados com o intuito de verificarmos a possibilidade de dosar antígenos circulantes, utilizando os anticorpos induzidos por veneno crotálico e toxina isolada irradiados como primeiro anticorpo.

Para a detecção de antígenos séricos foram escolhidas as técnicas ELISA e IRMA, do tipo sanduíche ou dois sítios, para a captura de antígenos, por serem sensíveis, reprodutíveis e práticas, quando comparadas às demais técnicas existentes, tais como imunofluorescência (IF), aglutinação (AGT) e imunodifusão radial dupla (IRD) (THEAKSTON, 1983).

3.6.1. Inoculação de toxinas em camundongos:

Camundongos fêmeas, *Swiss*, de 20 a 22g, mantidos no biotério do IPEN, Supervisão Radiobiologia (TB/TBM) em gaiolas forradas com maravalha de pinho, recebendo ração comercial e água *ad libitum*, foram distribuídos em grupos de quatro animais.

Cada animal foi inoculado, pela via intraperitoneal, com 10 μ g de toxina (veneno total ou crotoxina) num volume de 0,2ml, em solução salina, conforme protocolo descrito por BARRAL-NETO & SOHSTEN (1991).

Os camundongos foram sangrados pela via retro-orbital, em diferentes intervalos de tempo (0 a 190min). Os soros obtidos, a partir do sangue coletado, foram mantidos a -20°C para ensaios posteriores.

3.6.2. Detecção antígenos circulantes por ELISA:

Placas de microtitulação foram preenchidas com 100 μ l/poço do anti-soro comercial a 1:500 (50 μ g/ml) em tampão carbonato 50mM (pH 9,6) mantidas durante 16 a 18h à 4°C. Os espaços sem anticorpos adsorvidos foram preenchidos por BSA a 1% em PBST (200 μ l/poço), durante 1h à 37°C. Depois de lavadas, as placas receberam 100 μ l /poço das amostras (soro de camundongos) diluídos a 1:10 em PBST e foram incubados durante 30min a 37°C.

Após novo processo de lavagem, foram adicionados 100 μ l/poço dos anticorpos anticrotoxina irradiada e antiveneno total irradiado diluídos a 50 μ g/ml, em PBST. Passados 30min à 37°C, os poços foram lavados, e em

seguida adicionou-se 100µl/poço do segundo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado peroxidase, diluída a 1:1000 em PBST, que foi incubado durante 30min a 37°C.

Depois de lavadas, as placas receberam o substrato cromógeno orto-fenildiamina (OPD) por 20min a temperatura ambiente protegido da luz.

A reação foi parada pela adição de 50µl/poço de solução ácido cítrico 200mM e a densidade óptica foi determinada a 450nm em leitora de ELISA.

Os ensaios foram realizados em duplicata. Como controles foram utilizados: o tampão e o soro de camundongo inoculado com salina. Os valores encontrados para as amostras foram comparados com os valores de DO, provenientes de uma curva padrão do veneno crotálico, de 10 a 10⁻⁶µg/ml, que permitiram ajuste a uma função do tipo linear, conforme descrito no item 3.1.2.. O controle da especificidade foi avaliado por comparação a uma curva padrão do veneno de *B. jararaca*, de 10 a 10⁻⁶µg/ml.

Os dados referentes às detecções de antígenos séricos foram expressos como médias, e estatisticamente analisados pela análise de variância (ANOVA) para todos os experimentos.

Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de 5% de significância.

3.6.3. Detecção de antígenos circulantes por IRMA.

Placas de microtitulação foram preenchidas com 100µl/poço do anti-soro comercial a 1:500 (50µg/ml) em tampão carbonato 50mM (pH 9,6) mantidas durante 16 a 18h, a 4°C. Depois de lavadas, as placas receberam

100µl/poço das amostras (soro de camundongos) diluídos a 1:10 em PBST e foram incubados durante 30min a 37°C.

Após novo processo de lavagem, foram adicionados 100µl/poço dos anticorpos anticrotóxina irradiada e antiveneno total irradiado diluídos a 50µg/ml, em PBST. Passados 30min a 37°C, adicionou-se 100µl/poço de 30.000cpm de Proteína-A radioiodada, diluída em PBST, por 1h em temperatura ambiente. Depois de lavados, os poços foram cortados e a radioatividade de cada poço foi determinada durante 1min em contador gama.

Os ensaios foram realizados em duplicata. Como controles foram utilizados: o tampão, o soro de camundongo inoculado com salina. Os valores, em cpm, encontrados para as amostras, foram comparados com os valores de uma curva padrão do veneno crotálico, de 10 a 10⁻⁶µg/ml, do tipo linear, conforme descrito no item 3.1.2.. Uma curva padrão do veneno de *B. jararaca*, de 10 a 10⁻⁶µg/ml, foi aplicada como controle da especificidade. Os dados foram tratados conforme descrito no item 3.1.2..

IV. RESULTADOS:

4.1. Preparo de imunógenos:

As amostras do veneno crotálico e da crotoxina, depois de irradiadas, apresentaram-se levemente turvas.

4.2. Produção e detecção de anti-soros:

Os resultados mostraram que todos os animais imunizados responderam aos imunógenos (antígenos nativos e irradiados) inoculados.

Quanto aos níveis séricos de anticorpos, estes aumentaram rapidamente, principalmente após o quarto inóculo. Este fato foi observado para os 2 grupos de animais, conforme mostrado nas tabelas VII e VIII. Nestas tabelas encontram-se relacionados as respectivas diluições dos anti-soros, onde puderam ser observadas linhas de precipitação entre o complexo antígeno-anticorpo formado.

A figura 1, os itens A, B, C e D exemplificaram os padrões de linhas de precipitação formadas entre o veneno nativo e os diferentes soros, pela técnica de imunodifusão.

As figuras 2 e 3, correspondem a densidade óptica (DO), determinada por ELISA, dos anti-soros 1:10.000, no decorrer da imunização. Os animais do grupo 2 apresentaram DO mais baixa, quando comparados com os valores detectados nos animais do grupo 1.

Os animais 7 e 8 do grupo 1 morreram nas primeiras 48 horas após o primeiro inóculo, e o animal I do grupo 2 morreu após o quarto inóculo. O coelho 4 (grupo 1), inoculado com crotoxina nativa, foi eliminado por não responder bem ao imunógeno.

Quando detectados por ELISA, observou-se que os animais que responderam melhor aos imunógenos apresentaram anticorpos detectáveis até a diluição de 1:1.000.000, contra diluições de 1:250.000, para aqueles que responderam pouco. Quando detectados por IRMA, encontrou-se valores na ordem de 1:100.000 e 1:25.000, respectivamente.

Com base nos resultados encontrados, verificou-se que os animais 3, 5 e III, responderam bem aos imunógenos, apresentando elevados níveis de anticorpos. Os anti-soros destes animais foram escolhidos para os testes posteriores.

Tabela VII. Detecção semi-quantitativa de anticorpos séricos por imunodifusão radial dupla (IDR). Coelhos do grupo 1.

Sangrias (nº)	Coelhos					
	1	2	3	4	5	6
1	nd	4	8	nd	8	4
2	8	4	4	nd	16	4
3	8	8	8	2	nd	8
4	4	4	8	2	32	4
5	nd	16	2	2	128	8
6	4	4	16	8	128	4
7	2	nd	32	nd	64	nd
8	2	4	2	nd	128	16
9	32	128	64	8	256	32

Legenda: nd, não determinado.

Os animais 1, 2, 3 e 4 foram inunizados com crotoxina nativa e os animais 5 e 6 com veneno total irradiado.

Os resultados são média entre dois ensaios. Os valores correspondem à maior diluição dos soros onde foram observadas linhas de precipitação entre o complexo antígeno-anticorpo e estão expressos em 1:diluição.

O limite de confiança é de 95%.

Tabela VIII. Detecção semi-quantitativa de anticorpos séricos por imunodifusão radial dupla (IDR). Coelhos do grupo 2.

Sangrias (nº)	Coelhos							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	2	2	2	nd	nd	4	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd
3	4	8	8	4	8	8	8	2
4	nd	16	4	4	16	8	16	2
5	nd	16	nd	nd	nd	nd	16	4
6	nd	8	2	2	4	8	8	4
7	nd	8	4	4	4	4	8	4

Legenda: nd, não determinado.

Os animais I, II, III e IV foram imunizados com crotoxina irradiada e os animais V, VI, VII e VIII foram imunizados com crotoxina nativa.

Os resultados são média entre dois ensaios. Os valores correspondem à maior diluição dos soros onde foram observadas linhas de precipitação entre o complexo antígeno-anticorpo e estão expressos em 1:diluição.

O limite de confiança é de 95%.

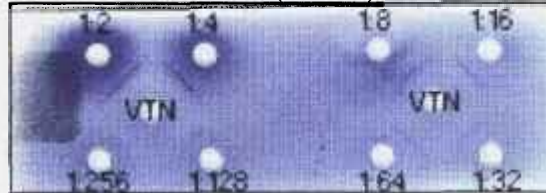
Resultados

Figura 1. Exemplo dos padrões de linhas de precipitação formadas entre o veneno crotálico nativo quando testado frente aos diferentes soros, de 1:2 a 1:256, pela técnica de imunodifusão (IRD).

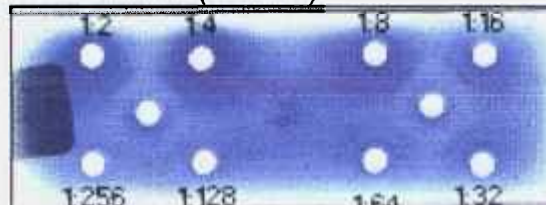
A. Veneno crotálico nativo (VTN a 0,5mg/ml) X soro anticrotálico comercial.



B. VTN X soro antiveneno total irradiado (SAVTI).



C. VTN X soro anticrotalina nativa (SACXN).



D. VTN X soro anticrotalina irradiada (SACXI).

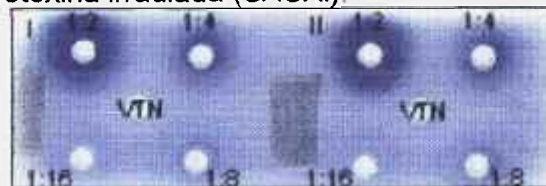
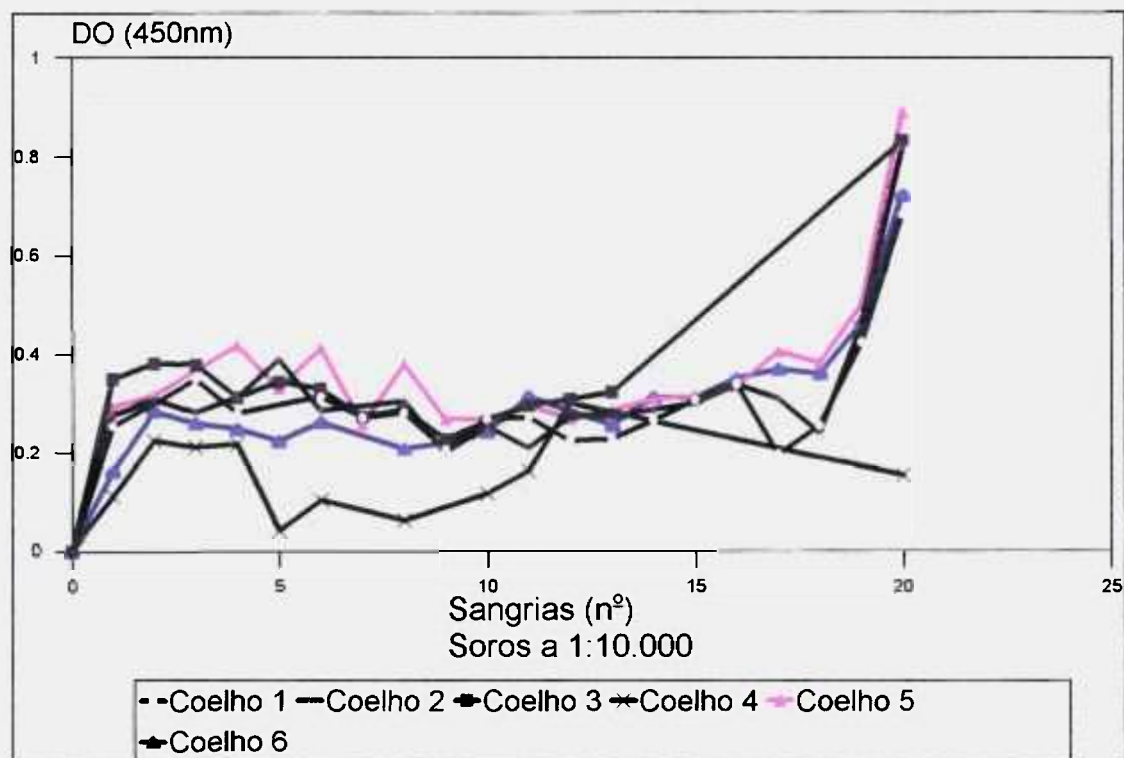


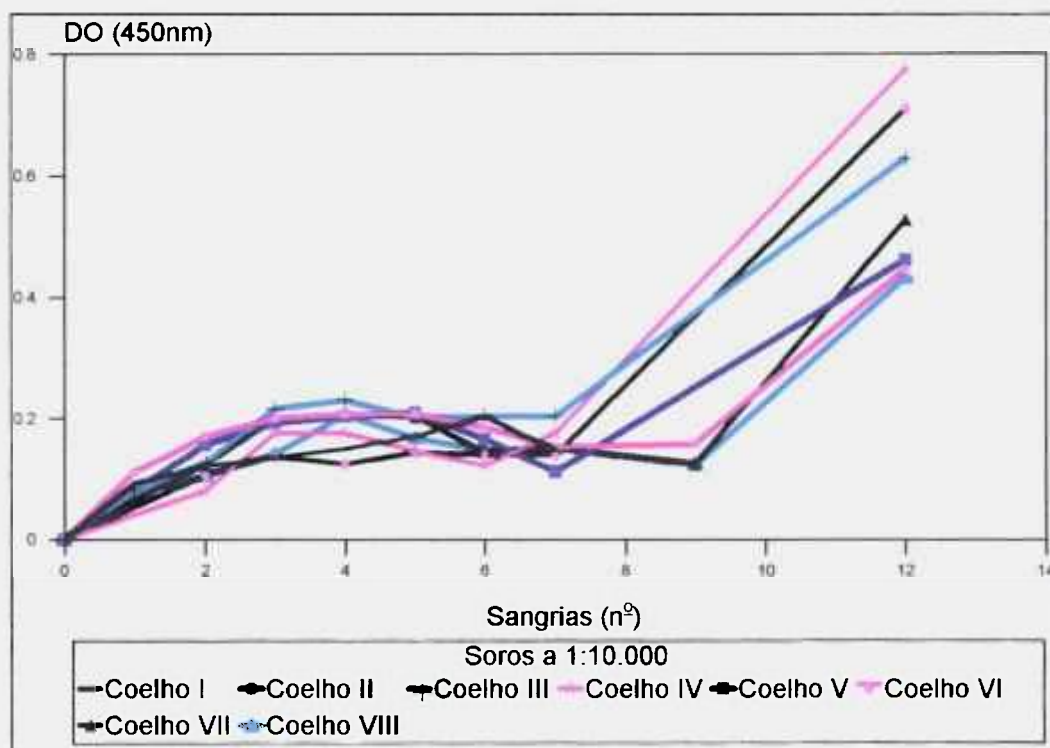
Figura 2. Perfil da resposta imune dos coelhos imunizados com toxinas nativas ou irradiadas ao longo do processo de imunização. DO dos soros coelhos grupo 1, a 1:10.000, das sangrias 6 a 19, por ELISA.



Os animais 1, 2, 3 e 4 foram imunizados com crotoxina nativa e os animais 5 e 6 com veneno total irradiado.

Cada ponto representa a média de quatro determinações. O coeficiente de variação foi 7%.

Figura 3. Perfil da resposta imune dos coelhos imunizados com toxinas nativas ou irradiadas ao longo do processo de imunização. DO dos soros coelhos grupo 2, a 1:10.000, das sangrias 3 a 12, por ELISA.



Os animais I, II, III e IV foram imunizados com crotoxina irradiada e os animais V, VI, VII e VIII com crotoxina nativa.

Cada ponto representa a média de quatro determinações. O coeficiente de variação foi 8%.

4.3. Especificidade dos anti-soros.

4.3.1. Avaliação da especificidade dos anti-soros produzidos frente ao veneno total de *C. d. terrificus* pela técnica de imunoelektroforese:

O ensaio de imunoelektroforese foi utilizado para verificar o padrão de linhas de precipitação formadas entre os antígenos do veneno crotático e os diferentes anticorpos (anti-soros anticrotático comercial, antiveneno total irradiado, anticrotoxina nativa e anticrotoxina irradiada).

O veneno crotático bruto foi reconhecido pelos diferentes anti-soros, conforme mostra a figura 4.

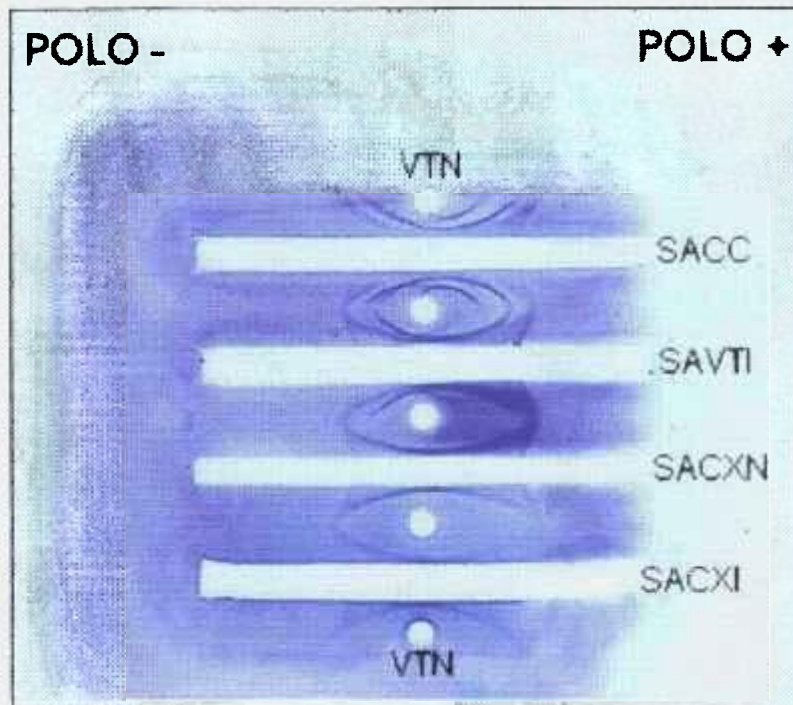
O soro anticrotático comercial reconheceu cinco bandas distintas do veneno. O soro antiveneno total irradiado reconheceu três bandas semelhantes às reconhecidas pelo soro comercial e uma banda distinta, não reconhecida pelo soro comercial, numa região diferente.

Os soros anticrotoxina nativa e anticrotoxina irradiada reconheceram uma banda, extremamente larga, na mesma região de uma das bandas reconhecida pelos soros comercial e antiveneno total irradiado.

Este experimento mostrou que as toxinas do veneno nativo foram reconhecidas, de modo similar, por todos os soros testados.

Resultados

Figura 4. Avaliação da especificidade dos anti-soros produzidos frente ao veneno total de *C. d. terrificus* pela técnica de imunoelectroforese.



Legenda: VTN, veneno total (0,5mg/ml); SACC, soro anticrotálico comercial (1:10); SAVTI, soro antiveneno total irradiado (1:10); SACXN, soro anticrotoxina nativa (1:10); SACXI, soro anticrotoxina irradiada (1:10).

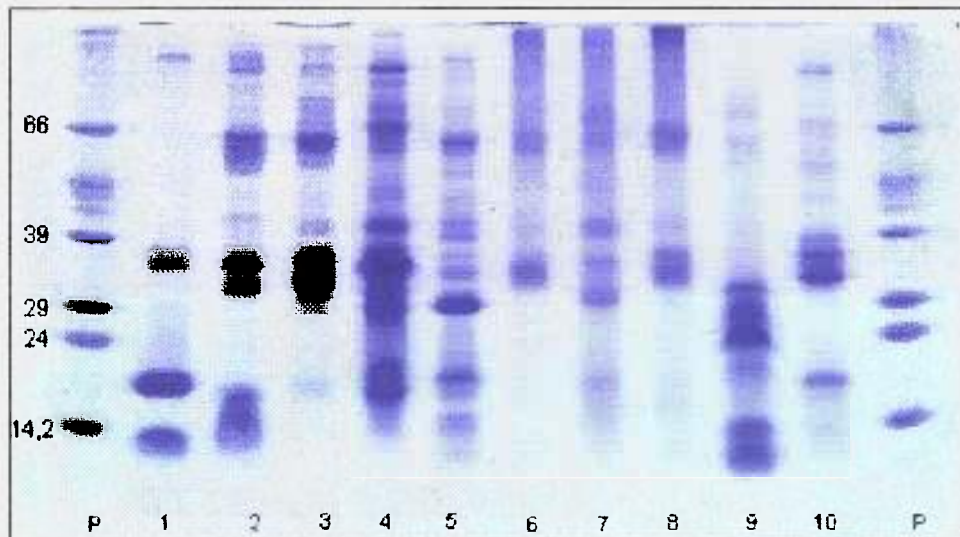
4.3.2. Avaliação da especificidade dos anti-soros frente a venenos de diferentes gêneros e espécies por *Western blotting*.

A figura 5 corresponde aos venenos de diferentes espécies de serpentes, conforme mostrado na legenda, depois da eletroforese (SDS-PAGE).

Todos os venenos apresentaram proteínas, separadas pela corrente elétrica, de alto, médio e baixo peso molecular, quando comparadas com o padrão Sigma.

O veneno crotálico apresentou poucas bandas, onde foi possível visualizar uma banda larga, que migrou na faixa correspondente entre os valores de 14.000 a 24.000 daltons. Os venenos botrópicos, em geral, apresentaram várias bandas, de diferentes pesos.

Figura 5. SDS-PAGE dos venenos de diferentes gêneros e espécies de serpentes.



Legenda: P, padrão de peso molecular; 1, *C.d. terrificus* ; 2, *C.d. cumanensis*;
3, *B. jararaca*; 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B.*
alternatus; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta*.

A figura 6, mostrou que o soro anticrotálico comercial reconheceu várias bandas de proteínas, de alto, médio e baixo peso molecular, em todos os venenos testados.

O soro antiveneno total irradiado, conforme mostrado na figura 7, reagiu plenamente com o veneno de *C. d. terrificus*. Este soro reagiu também com: uma banda na faixa de 29.000 a 39.000 daltons no veneno de *C. d. cumanensis*; algumas bandas na faixa entre 29.000 a 39.000 daltons nos venenos de *Bothrops neuwiedi*, *B. cotiara*, *Micrurus frontalis* e *Lachesis muta sp*; bandas na faixa de 14.000 a 24.000 daltons nos venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. cotiara*, *M. frontalis* e de *L. muta sp*.

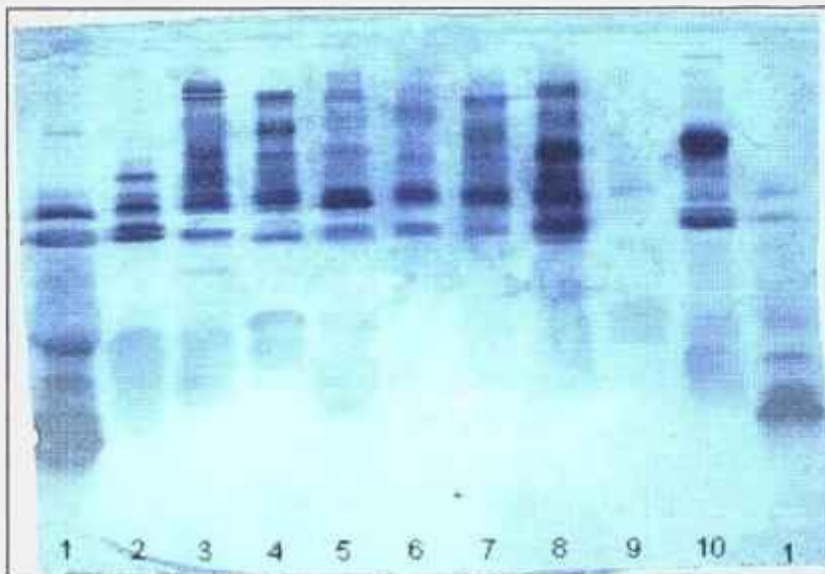
O soro anticrotoxina nativa, conforme mostrado na figura 8, reagiu com várias bandas do veneno de *C. d. terrificus*, de baixo peso molecular, de 14.000 a 24.000, de 29.000 a 45.000 daltons, e de alto peso molecular. Bandas de baixo peso, de 20.000 a 29.000, e acima de 45.000 daltons do veneno de *C. d. cumanensis* foram reconhecidas. Os venenos botrópicos apresentaram algumas bandas reconhecidas: uma banda em torno de 45.000 daltons no veneno de *B. neuwiedi*; bandas de 29.000, 45.000 e de 66.000 daltons no veneno de *B. cotiara*; banda entre 14.000 a 20.000 daltons no veneno de *L. muta sp*. Os demais venenos não apresentaram bandas reconhecidas.

O soro anticrotoxina irradiada, conforme observado na figura 9, reagiu com bandas de baixo peso molecular, e de peso de 24.000 a 39.000 daltons do veneno de *C. d. terrificus*; entre 14.000 a 20.000, 39.000 a 45.000 daltons, e de alto peso molecular do veneno de *C. d. cumanensis*. Para os venenos

botrópicos, verificou-se que foram reconhecidas bandas de 39.000 e de 45.000 daltons no veneno de *B. jararacussu*; uma banda de 39.000 daltons no veneno de *B. moojeni*. Os demais venenos não apresentaram bandas reconhecidas.

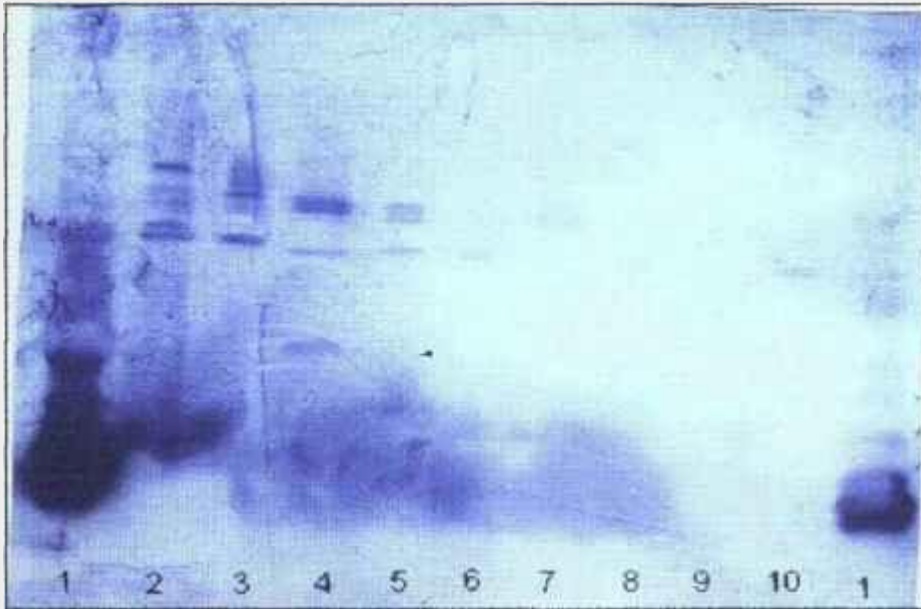
Os dados obtidos no final deste experimento foram de maior valia para a escolha do anticorpo a ser utilizado para o desenvolvimento de um imunoensaio específico para toxinas do veneno crolálico.

Figura 6. Avaliação da especificidade do soro anticrotálico comercial frente aos venenos de diferentes gêneros e espécies por *Western blotting*.



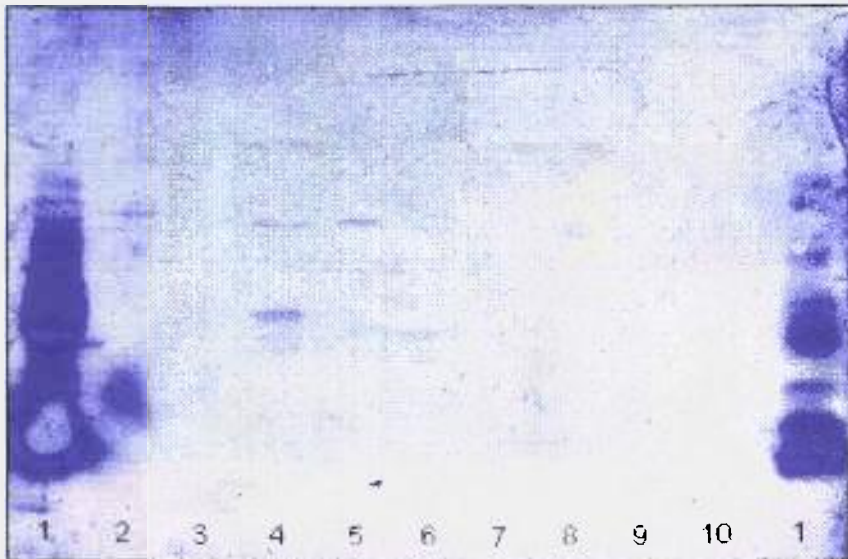
Legenda: 1, *C.d. temificus* ; 2, *C.d. cumanensis*; 3, *B. jararaca*; 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B. alternatus*; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta*.

Figura 7. Avaliação da especificidade do soro antiveneno total irradiado frente aos venenos de diferentes gêneros e espécies por *Western blotting*.



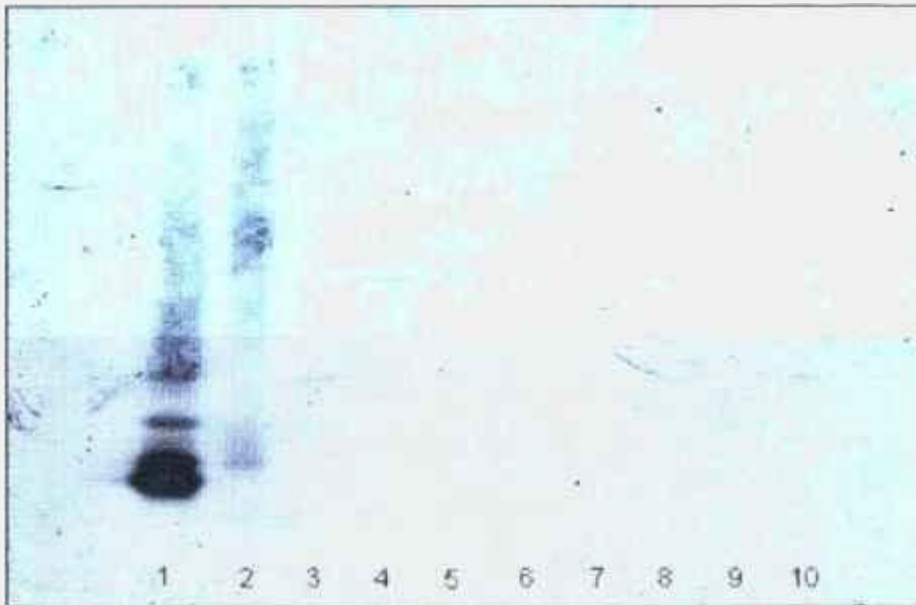
Legenda: 1, *C.d. terrificus* ; 2, *C.d. cumanensis*; 3, *B. jararaca*; 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B. alternatus*; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta*.

Figura 8. Avaliação da especificidade do soro anticrotoxina nativa frente aos venenos de diferentes gêneros e espécies por *Western blotting*.



Legenda: 1, *C.d. terrificus* ; 2, *C.d. cumanensis*; 3, *B. jararaca*, 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B. alternatus*; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta.*.

Figura 9. Avaliação da especificidade do soro anticrotoxina irradiada frente aos venenos de diferentes gêneros e espécies por *Western blotting*.



Legenda: 1, *C.d. terrificus* ; 2, *C.d. cumanensis*; 3, *B. jararaca*; 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B. alternatus*; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta*.

4.3.3. Avaliação da especificidade dos anti-soros frente a venenos de diferentes gêneros e espécies por ELISA:

Os anti-soros foram testados frente a venenos de diferentes gêneros e espécies de serpentes. A figura 10 corresponde à densidade óptica (DO), detectada a 450nm, apresentada pelos anti-soros testados a uma diluição de 1:1.000, onde foi observado que:

- o soro anticrotálico comercial apresentou DO maior que 0,800 para todos os venenos testados, com exceção ao veneno de *M. frontalis*, que apresentou DO em torno de 0,400;
- o soro antiveneno total irradiado apresentou DO maior que 0,800 para os venenos crotálicos, de 0,300 a 0,800 para os demais venenos;
- os soros anticrotoxina irradiada e anticrotoxina nativa apresentaram DO maior que 0,800 para o veneno de *C.d. terrificus*, em torno de 0,400 para o veneno de *C. d. cumanensis*, e de 0,100 a 0,400 para os demais venenos;
- o soro antibotrópico apresentou DO maior que 0,700 para os venenos testados, exceto para o veneno de *M. frontalis*, onde a DO foi 0,400.

A tabela X, mostrou as diluições máximas, de densidade óptica detectável por ELISA, dos soros, testados com os diferentes venenos.

O soro anticrotálico comercial apresentou DO detectável quando diluído acima da ordem 10^{-6} para todos os venenos testados.

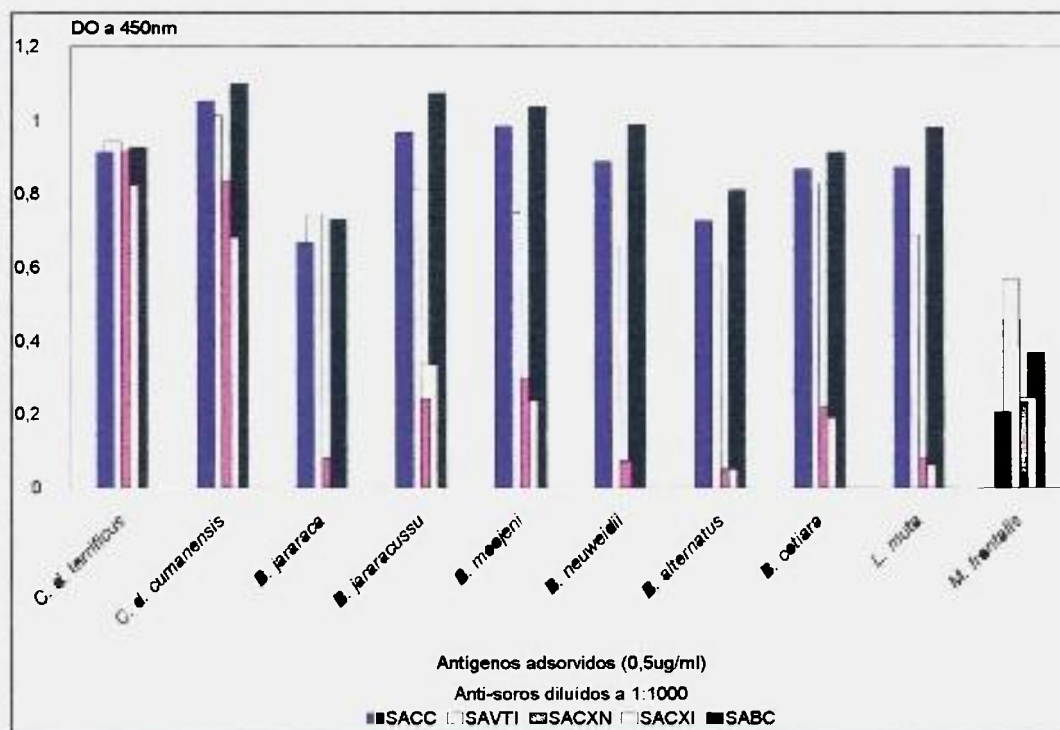
O soro antiveneno total irradiado se comportou de modo diferente: apresentou anticorpos detectáveis à diluições na ordem de 10^{-6} para os venenos *C. d. terrificus*, *C. d. cumanensis* e *B. cotiara*. Para os venenos de

B. jararaca, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi*, e *L. muta sp.*, na ordem de 10^{-5} , e na ordem de 10^{-3} para o veneno de *M. frontalis*.

O soro anticrotoxina irradiada apresentou DO detectáveis na ordem de 10^{-6} para o veneno *C. d. terrificus*; 10^{-5} para o veneno de *C. d. cumanensis*; 10^{-4} para os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* e *M. frontalis*; e na ordem de 10^{-3} para os venenos de *B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. cotiara* e *L. muta sp.*

O soro anticrotoxina nativa apresentou títulos na ordem de 10^{-6} para os venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. cumanensis*; 10^{-5} para o veneno de *B. cotiara*; 10^{-4} para os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *L. muta sp.*; e na ordem de 10^{-3} para o veneno de *M. frontalis*.

Figura 10. Avaliação da especificidade dos anti-soros diluídos a 1:1000 frente aos venenos de diferentes gêneros, espécies e subespécies de serpentes por ELISA.



Legenda: SACC, soro anticrotálico comercial; SAVTI, soro antiveneno total irradiado; SACXN, soro anticrotoxina nativa; SACXI, soro anticrotoxina irradiada; SABC, soro antibotrópico comercial.

Tabela X. Avaliação da especificidade dos anti-soros frente aos venenos de diferentes gêneros, espécies e subespécies de serpentes por ELISA.

Venenos	Soros (1:diluição)			
	SACC	SAVTI	SACXN	SACXI
1	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
2	1.000.000	1.000.000	1.000.000	200.000
3	1.000.000	200.000	20.000	20.000
4	1.000.000	200.000	20.000	20.000
5	1.000.000	200.000	20.000	20.000
6	1.000.000	200.000	2.000	2.000
7	1.000.000	200.000	20.000	2.000
8	1.000.000	1.000.000	200.000	2.000
9	1.000.000	20.000	2.000	20.000
10	1.000.000	200.000	20.000	2.000

Legenda: 1, *C.d. terrificus* ; 2, *C.d. cumanensis*; 3, *B. jararaca*; 4, *B. jararacussu*; 5, *B. moojeni* ; 6, *B. neuweidi*; 7, *B. alternatus*; 8, *B. cotiara*; 9, *M. frontalis*; 10, *L. muta*; **SACC**, anticrotálico comercial; **SAVTI**, antiveneno total irradiado; **SACXN**, anticrotoxina nativa; **SACXI**, anticrotoxina irradiada.

Resultados

4.4. Isolamento das imunoglobulinas G (IgGs):

As imunoglobulinas G (IgGs) dos soros antiveneno total irradiado, anticrotoxina irradiada e anticrotoxina nativa, precipitadas com sulfato de amônio, apresentaram-se turvas depois de ressuspensas em PBS, e permaneceu da mesma forma depois de dialisado contra salina.

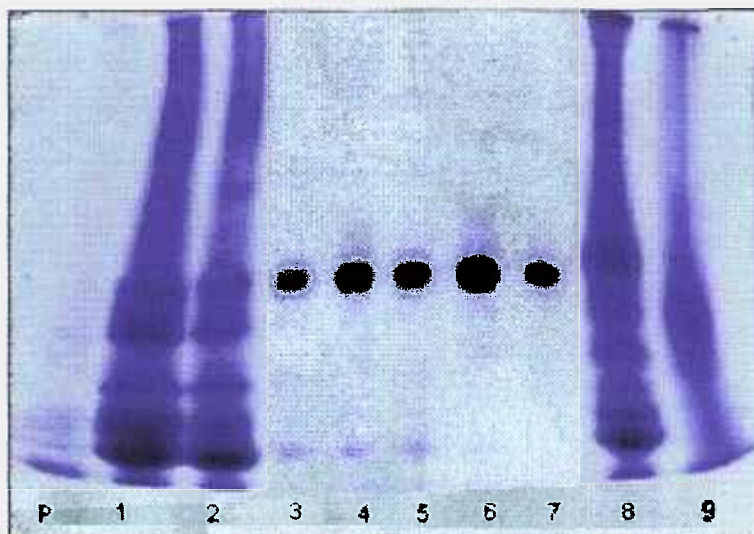
As soluções de IgG precipitadas, depois de cromatografadas por afinidade, tornaram-se límpidas. Durante a cromatografia não foram observadas alterações de turbidez ou formação de material precipitado.

A pureza das IgGs isoladas, avaliada por eletroforese após cada etapa de purificação, conforme mostrado na figura 11, indicou que:

- as IgGs isoladas por precipitação com sulfato de amônio apresentaram duas bandas distintas, sendo que uma encontra-se na faixa correspondente à da albumina;
- as IgGs precipitadas e depois cromatografadas, ou somente cromatografadas, apresentaram uma única banda;
- o soro anticrotálico comercial apresentou várias bandas;
- os soros de coelho e de cavalo não imunizados com venenos apresentaram perfil característico, com visualização de várias bandas de diferentes faixas de peso molecular.

Figura 11. Perfil eletroforético dos soros em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Amostras nas diferentes etapas de isolamento das imunoglobulinas (IgGs).



Legenda: P, padrão de peso molecular; 1, soro de coelho não imunizado; 2, soro de coelho imunizado; 3, IgG antiveneno total irradiado precipitada; 4, IgG anticrotóxina irradiada precipitada; 5, IgG anticrotóxina nativa; 6, IgG antiveneno total irradiado precipitada e cromatografada; 7, IgG anticrotóxina irradiada cromatografada; 8, soro de cavalo imunizado com veneno crotálico não tratado (Instituto Butantan); 9, soro anticrotálico comercial (Instituto Butantan).

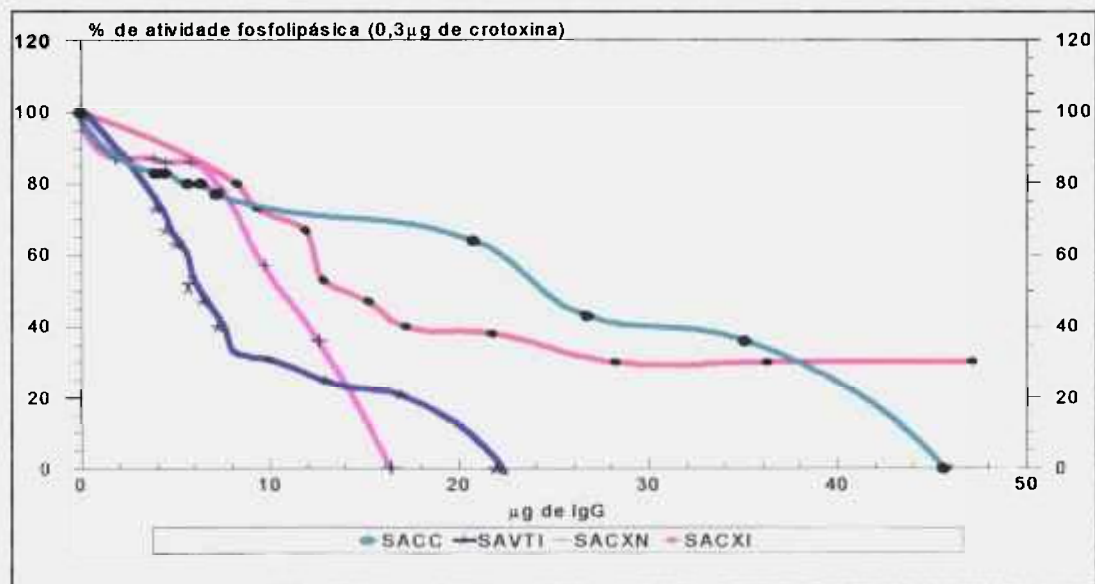
4.5. Avaliação da capacidade neutralização da atividade da fosfolipase A₂ da crotoxina *in vitro* pelas diferentes IgGs isoladas:

A figura 12, referente às curvas de atividade fosfolipásica da crotoxina na presença das diferentes IgGs. Os valores representam a média de triplicata e o valor de 100% de atividade de 0,3μg de crotoxina nativa.

As curvas mostraram que as IgGs anticrotoxina nativa, antiveneno total irradiado e soro anticrotálico comercial neutralizaram totalmente a atividade fosfolipásica da crotoxina, enquanto a mesma atividade não foi totalmente neutralizada pela IgG anticrotoxina irradiada.

A tabela XI mostra o montante de IgG necessários para a soroneutralização (*in vitro*) parcial (50%) e total (100%) da atividade enzimática (fosfolipásica) da crotoxina. Foram necessários 9,68 e 16,37μg da IgG anticrotoxina nativa; 5,68 e 21,92μg da IgG antiveneno total irradiado; contra 20,76 e 45,61μg do soro anticrotálico comercial; 16,68μg da IgG anticrotoxina irradiada neutralizou 50% da atividade testada, no entanto quando testada até 50μg de IgG, não foi observada a neutralização total (100%) da atividade fosfolipásica.

Figura 12. Avaliação da capacidade neutralizante *in vitro* da atividade fosfolipásica da crotoxina pelas IgGs isoladas.



Legenda: SAVTI, IgG antiveneno total irradiado; SACXI, IgG anticrotoxina irradiada; SACXN, IgG anticrotoxina nativa; SACC, soro anticrotálico comercial. Os valores representam a média de 3 ensaios e foram expressados em % de atividade.

100% de atividade = atividade fosfolipásica de 0,3µg de crotoxina nativa na presença de salina.

0% de atividade = atividade fosfolipásica de 0,3µg de crotoxina nativa neutralizada pelas diferentes IgGs.

Tabela XI. Avaliação da capacidade neutralizante *in vitro* da atividade fosfolipásica da crotoxina pelas IgGs isoladas.

IgG	% de Atividade da fosfolipase A ₂ da crotoxina (μg de IgG / 0,3 μg de crotoxina)		
	0	50	100
AVTI	21,92	5,68	0
ACXI	> 50	16,68	0
ACXN	16,37	9,68	0
SACC	45,61	20,76	0

Legenda: AVTI, IgG antiveneno total irradiado; ACXI, IgG anticrotoxina irradiada; ACXN, IgG anticrotoxina nativa; SACC, soro anticrotálico comercial (Inst. Butantan).

4.6. Detecção e quantificação do veneno total de *C. d. terrificus* e da crotoxina:

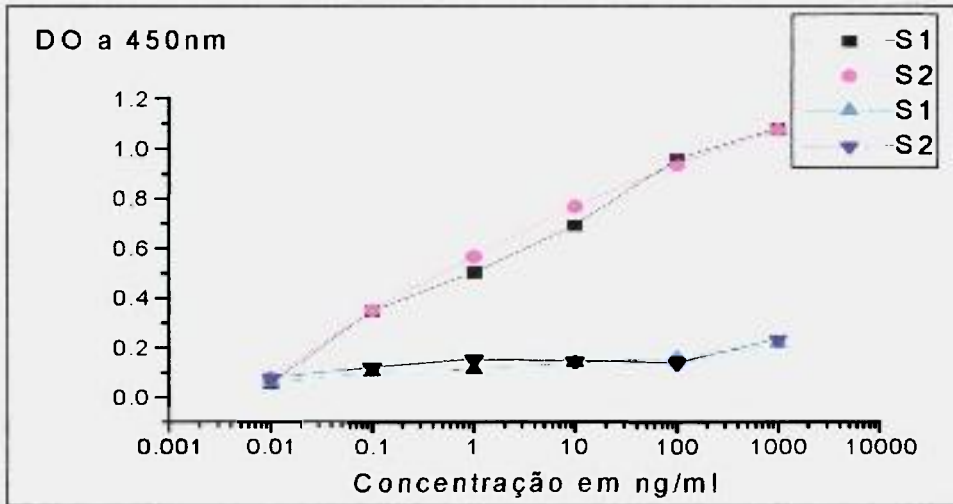
Durante a padronização e comparação entre os ensaios verificou-se que:

- a detecção do veneno crotálico ou da crotoxina pelos ensaios ELISA e IRMA, técnica de captura de antígenos, utilizando os anti-soros induzidos por toxinas irradiadas como primeiro anticorpo foi possível, sendo que os soros testados reagiram com as toxinas nativas.
- as curvas-padrão dos venenos de *C. d. terrificus* e de *B. jararaca* se comportaram de modo semelhante, conforme mostrado nas figuras 13 e 14, para o ELISA e IRMA, respectivamente, sendo que os pontos das curvas do veneno botrópico apresentaram valores próximos aos valores detectados em soro de camundongos inoculados com salina (controle negativo).
- o IRMA apresentou "background" elevado, quando comparado com o ELISA.

O teste estatístico de análise de variância ANOVA aplicado mostrou que as diferenças entre ensaios das curvas-padrão, revelados com os diferentes anti-soros (antiveneno total irradiado/SAVTI ou anticrotoxina irradiada/SACXI), não foram significativas.

Figura 13. Padronização da técnica ELISA para detecção de veneno crotálico.

Curva-padrão dos venenos de cascavel (*C. d. terrificus*) e de jararaca (*B. jararaca*).



Legenda: S1, Soro antiveneno total irradiado; S2, soro anticrotoxina irradiada; VT, veneno total

Análise estatística ANOVA:

Veneno crotálico:

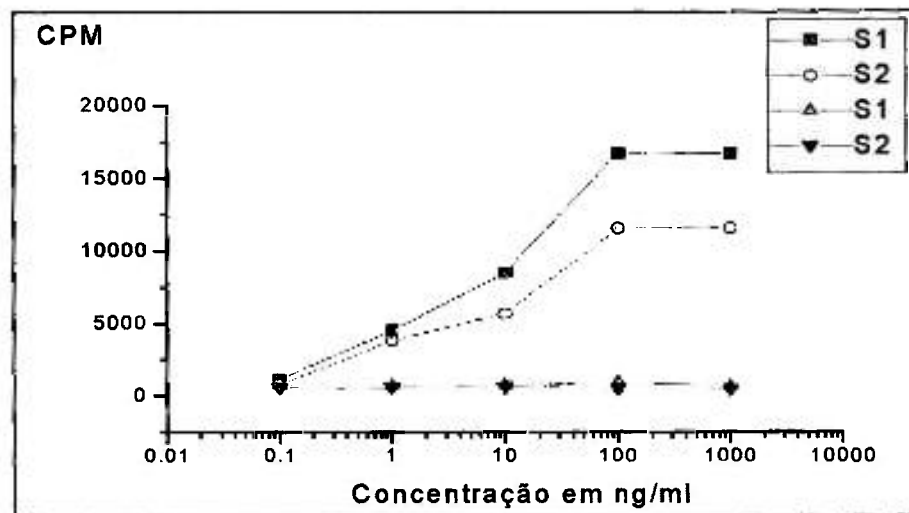
Curva VT x S1: $\log Y = 1,01957 + 0,14193 \cdot \log X$; $r = 0,947$ e desvio (D) = 0,114

Curva VT x S2: $\log Y = 1,18575 + 0,16506 \cdot \log X$; $r = 0,897$ e D = 0,170

Curva média: $\log Y = 1,095 + 0,204 \cdot \log X$; $r = 0,964$; D = 0,133; erro (E) = 0,0502 e probabilidade (p) = 0,06462. Ao nível de 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

Veneno botrópico: Variação (v) = 0,26276 e p = 0,61936. Ao nível de 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

Figura 14. Padronização da técnica IRMA para detecção de veneno crotálico. Curva-padrão dos venenos de cascavel (*C. d. terrificus*) e de jararaca (*B. jararaca*).



Legenda: S1, Soro antiveneno total irradiado; S2, soro anticrotalina irradiada; VT, veneno total

Análise estatística ANOVA:

Veneno crotálico:

Curva VT x S1: $\log Y = 10201,4 + 2112,8 \cdot \log X$; $r = 0,942$ e desvio (D) = 1781,6

Curva VT x S2: $\log Y = 9550,6 + 2030,8 \cdot \log X$; $r = 0,955$ e D = 1493,25

Curva média: $\log Y = 13731,2 + 2580,0 \cdot \log X$; $r = 0,924$; D = 2332,5; erro (E) = 881,6 e probabilidade (p) = 0,00843. Ao nível de 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

Veneno botrópico: Variação (v) = 0,276 e p = 0,9236. Ao nível de 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

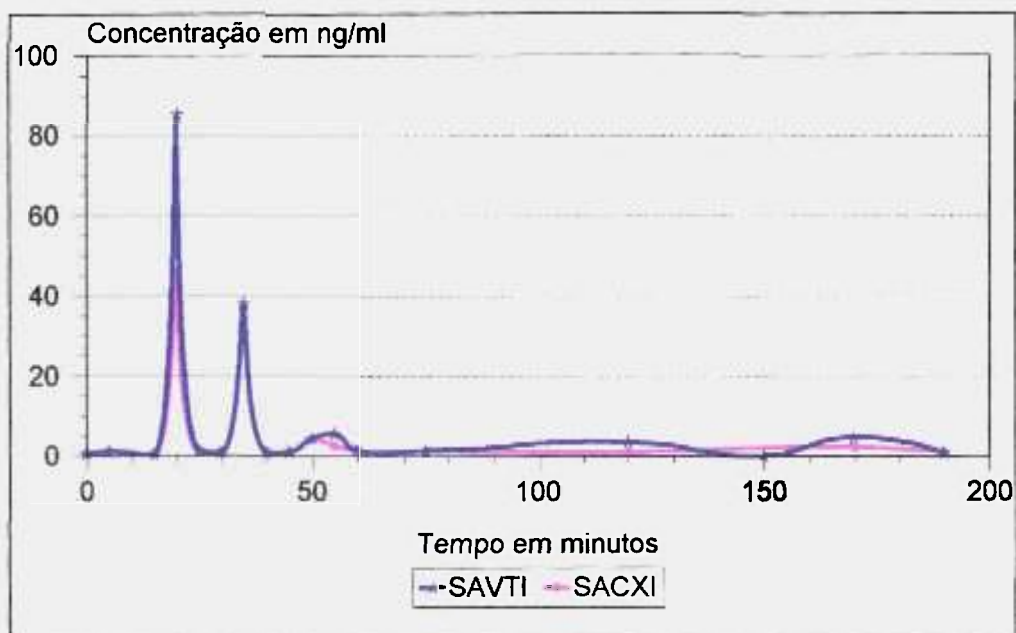
As figuras 15 (ELISA) e 16 (IRMA) referentes a detecção do veneno crotálico nativo pelas duas técnicas, mostraram que:

- as curvas de cinética do veneno total apresentaram perfil semelhante para as duas técnicas e para os dois soros testados. Observou-se que nos primeiros 15 minutos após inóculo, os antígenos não puderam ser detectados; no período de 20 a 50 minutos, os níveis séricos de antígenos aumentaram e permaneceram oscilantes; e a partir de 60 minutos, estes decresceram consideravelmente, sendo que os valores detectados apresentaram níveis próximos aos valores encontrados para os animais que receberam salina.
- a análise estatística indicou que as curvas de cinética não foram significativamente diferentes. Contudo, quando os pontos 20, 35 e 120 minutos foram testados isoladamente, as diferenças foram significativamente diferentes.

No que se refere aos níveis séricos da crotoxina isolada, as figuras 17 (ELISA) e 18 (IRMA), mostraram que:

- as curvas de cinética da crotoxina apresentaram perfil semelhante para as duas técnicas e soros testados, sendo que nos primeiros 10 minutos houve um aumento acentuado no montante de antígenos circulantes, seguido de oscilação no intervalo entre 15 a 60 minutos; e decréscimo a partir de 75 minutos até valores próximos aos dos animais que receberam salina.
- a análise estatística indicou que as curvas de cinética da crotoxina isolada não foram significativamente diferentes. No entanto, quando testados isoladamente, os pontos 15, 45 e 120 minutos, apresentaram diferenças significativas.

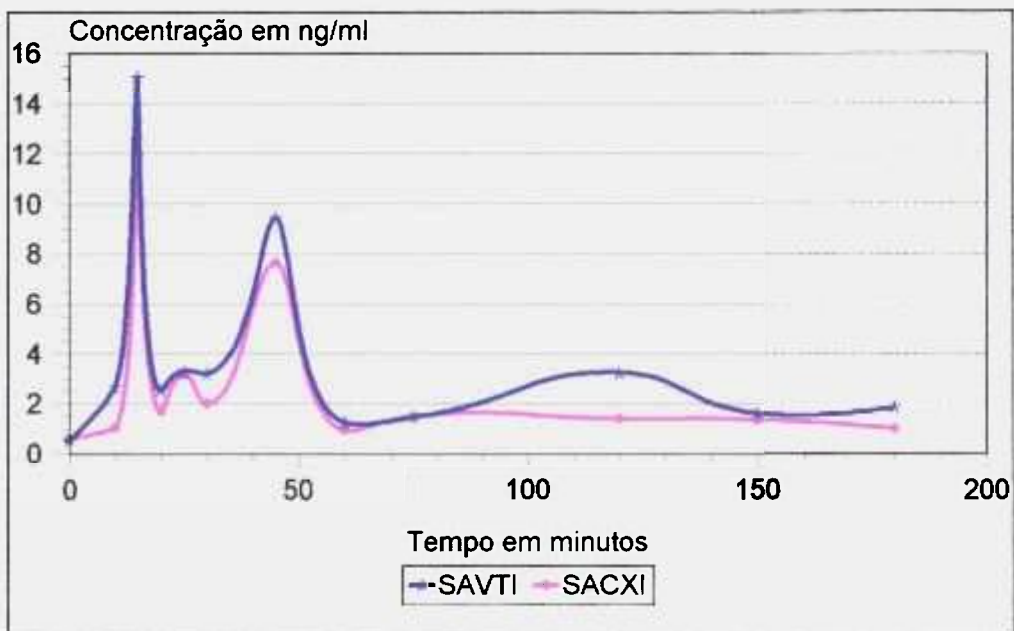
Figura 15. Detecção do veneno crotálico em soro de camundongos por ELISA.



A quantidade de veneno total (média ± desvio padrão), detectado nos tempos 20, 35 e 120 minutos, utilizando o SAVTI foram $85,55 \pm 15,95$; $38,1 \pm 4,8$; $3,5 \pm 2,7$; e com o SACXI $46,4 \pm 15,5$; $37,0 \pm 13,3$; e $16,2 \pm 15,7$, respectivamente.

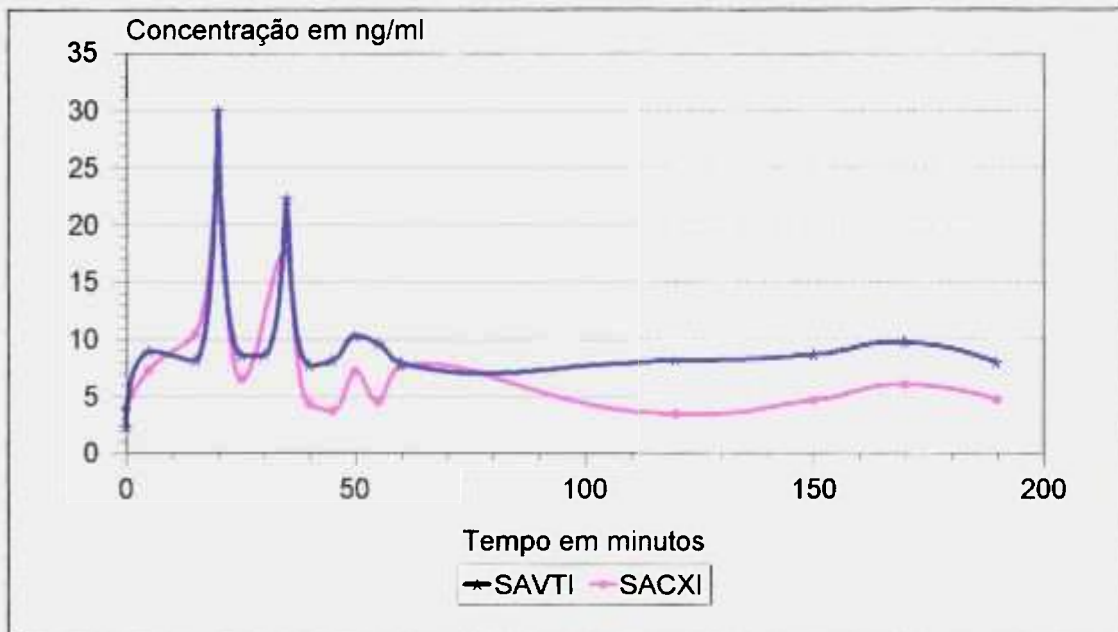
Resultados

Figura 16. Detecção da crotoxina em soro de camundongos por ELISA.



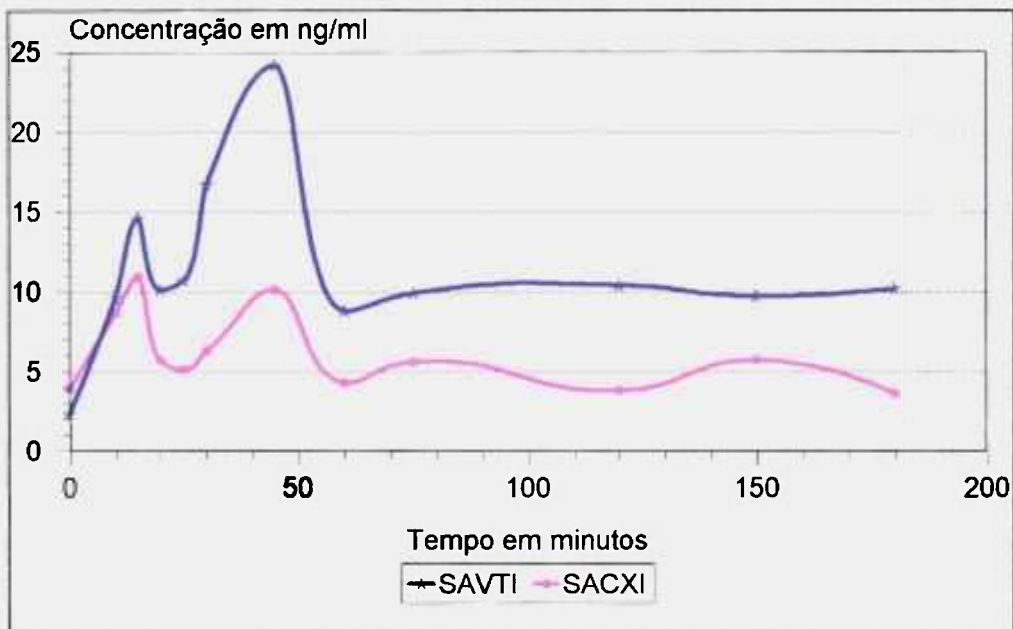
A quantidade de crotoxina isolada (média \pm desvio padrão), detectada nos tempos 15, 45 e 120 minutos, utilizando o SAVTI foram $15,05 \pm 4,5$; $9,45 \pm 1,15$; $3,25 \pm 0,45$; e com o SACXI: $12,7 \pm 2,6$; $7,65 \pm 0,05$; e $1,4 \pm 0,01$, respectivamente.

Figura 17. Detecção do veneno crotálico em soro de camundongos por IRMA.



A quantidade de veneno total (média \pm desvio padrão), detectado nos tempos 20, 35 e 120 minutos, utilizando o SAVTI foram $30,0 \pm 15,95$; $22,3 \pm 4,8$; $8,1 \pm 2,7$; e com o SACXI $23,4 \pm 15,5$; $17,7 \pm 13,3$; e $3,4 \pm 5,7$, respectivamente.

Figura 18. Detecção da crotoxina em soro de camundongos por IRMA.



A quantidade de crotoxina isolada (média \pm desvio padrão), detectada nos tempos 15, 45 e 120 minutos, utilizando o SAVTI foram $14,6 \pm 4,5$; $24,2 \pm 1,15$; $10,4 \pm 0,45$; e com o SACXI $10,9 \pm 2,6$; $10,1 \pm 0,05$; e $3,8 \pm 0,01$, respectivamente.

V. DISCUSSÃO:

A radiação gama tem se mostrado excelente ferramenta para a atenuação de venenos de serpentes e toxinas isoladas. Muitos pesquisadores verificaram que após a irradiação, as propriedades antigênicas e imunogênicas são preservadas e a toxicidade reduzida. MURATA (1988) e GUARNIERI (1992), verificaram que os venenos crotálico e botrópicos, depois de irradiados com taxa de dose de 2.000Gy em fonte de fonte ^{60}Co , apresentavam sua toxicidade diminuída em torno de cinco vezes.

MURATA (1988) verificou que, após irradiação, a solução de veneno crotálico apresentou teor proteico reduzido. HATI *et al* (1990), NASCIMENTO (1991), e MANDAL *et al* (1993) não observaram a presença de material precipitado em suas amostras. NASCIMENTO (1991), eliminou a formação de material precipitado pela acidificação da solução, explicando que a formação de material precipitado depende das condições de irradiação às quais os venenos são expostos.

No presente estudo, as amostras de veneno crotálico e da crotoxina isolada, irradiadas em solução salina fisiológica, apresentaram material precipitado, sugerindo que as mudanças induzidas pela radiação gama provocaram alterações na solubilidade destas proteínas.

Os níveis séricos de anticorpos, induzidos por antígenos irradiados, foram iguais ou mais altos, quando comparados com anticorpos induzidos por

antígenos não irradiados, mostrando que a imunogenicidade dos venenos irradiados foi preservada.

Estes anticorpos puderam ser detectados por técnicas imunológicas como imunodifusão (IDR), imunoenzimática (ELISA) e imunorradiométrica (IRMA), concordando com os achados de HATI *et al* (1990), GUARNIERI (1992), NASCIMENTO (1991) e MANDAL *et al* (1993).

BARIDE *et al* (1980), ressaltaram em seus estudos que proteínas de alto peso molecular são mais imunogênicas, e conseqüentemente, são importantes na indução de anticorpos contra toxinas.

NASCIMENTO (1995), separou por cromatografia de exclusão molecular frações de alto e baixo peso molecular da crotoxina irradiada, e verificou que ambas eram imunogênicas. A fração de alto peso molecular, ou agregado, se mostrou desprovida de toxicidade, e capaz de induzir a produção de anticorpos capazes de reconhecer a crotoxina não irradiada. A fração de baixo peso molecular se comportou como a crotoxina não irradiada, com todas suas propriedades tóxicas preservadas.

CARDI (1995), utilizando técnicas imunohistoquímicas, verificou que macrófagos isolados (que no sistema imune é uma das células responsáveis pela apresentação de antígenos), expostos à crotoxina irradiada sofreram menor dano, e apresentaram altas concentrações da toxina em seu citoplasma. As células expostas à crotoxina não irradiada morreram durante a primeira hora, sugerindo que as toxinas irradiadas são facilmente fagocitadas pelas células apresentadoras de antígeno sem alterar a viabilidade destas células. Estes fatos somados, podem explicar o rápido aumento dos níveis

Discussão

séricos de anticorpos, observados ao longo do processo de imunização, para os antígenos irradiados.

Deve-se ressaltar que, os animais imunizados com as toxinas irradiadas sofreram os efeitos tóxicos dos venenos, porém com menor intensidade que os animais imunizados com as toxinas nativas, concordando com os achados de NASCIMENTO (1991) e GUARNIERI (1992).

Através das técnicas de imunodifusão, imunoelektroforese e *western blotting* foi possível verificar que os soros antiveneno total irradiado e anticrotoxina irradiada reconheciam o veneno crotálico e a crotoxina isolada não irradiados, concordando com os resultados descritos por MANDAL *et al* (1993), quando testaram anticorpos antiveneno de *Vipera russelli* irradiado frente ao veneno não irradiado.

Com o auxílio das técnicas *western blot* e ELISA, foi possível verificar que todos os anticorpos induzidos por crotoxina nativa reconheciam os venenos de *C. d. terrificus* e de *C. d. cumanensis* e alguns venenos botrópicos (*B. jararacussu*, *B. neuweidi*, *B. alternatus* e *B. cotiara*). O soro anticrotoxina irradiada reagiu parcialmente com o veneno de *C. d. cumanensis* e reconheceu apenas algumas bandas dos demais venenos testados (*B. jararacussu*, *B. neuweidi* e *B. cotiara*). O soro antiveneno total irradiado reconheceu os venenos crotálicos (2) e bandas de baixo e médio peso molecular dos venenos botrópicos (6). O soro comercial reconheceu bandas de baixo, média e alto peso molecular dos venenos crotálicos (2), botrópicos (6) e laquélico (1) testados, sugerindo que os anti-soros induzidos por toxinas irradiadas se comportaram de forma mais específica.

Muitos pesquisadores relatam que os venenos são mosaicos de antígenos que refletem as variações de cada espécie. Uma das proteínas mais frequentes nos venenos animais é a fosfolipase A₂. Estas proteínas apresentam em comum as propriedades catalíticas, com diversidade de toxicidade, e alto grau de homologia estrutural (KINI & EVANS, 1989; YANG, 1994), mesmo entre serpentes oriundas de diferentes regiões geográficas (KORNALÍK & TÁBORSKÁ, 1989). O alto grau de similaridade antigênica, associado à alta taxa de reatividade imunológica cruzada, sugere a presença de epitopos em comum (AIRD & KAISER, 1985; OWNBY & COLBERG, 1990; HENEINE *et al*, 1990; HENEINE & CATTY, 1993; CHIPPAUX *et al*, 1991; CHOUMET *et al*, 1991; MIDDLEBROOK, 1991; ANDERSON *et al*, 1993).

As alterações de especificidade, observada para os soros antitoxinas irradiadas, poderiam ser resultado das mudanças conformacionais decorrentes da irradiação, tais como a exposição de grupos aromáticos, que estavam escondidos em regiões hidrofóbicas, ou, o desdobramento das cadeias polipeptídicas, conforme relatado por vários pesquisadores (BARIDE *et al*, 1980; MURATA, 1988; NASCIMENTO, 1991; GUARNIERI, 1992). Estas alterações nas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias, resultantes da ação da radiação ionizante (quebras, desdobramentos e agregação) (SOUZA-FILHO *et al*, 1992), podem expor sítios antigênicos e enzimáticos (MANDAL *et al*, 1993), ou diferentes determinantes antigênicos, que nas moléculas em estado natural encontravam-se protegidos (MANDAL *et al*, 1991).

No caso do soro antiveneno total irradiado, sua reatividade com os venenos botrópicos diminuiu sensivelmente, porém não foi totalmente eliminada, sugerindo que pode ocorrer proteção mútua entre as proteínas no momento da irradiação (BARIDE *et al*, 1980; GUARNIERI, 1992). No entanto, o soro anticrotoxina irradiada pouco reagiu com os venenos botrópicos, fato que sugere que ao irradiamos a crotoxina isolada, por ela ser a única proteína presente na amostra, é o alvo durante a exposição (NASCIMENTO, 1991).

A capacidade neutralizante dos anticorpos foi avaliada, segundo a técnica descrita por GUTIÉRREZ *et al* (1988). Os dados mostraram que o veneno irradiado induziu à formação de anticorpos com capacidade de neutralizar a atividade da fosfolipase A₂ da crotoxina. Por outro lado, os anticorpos induzidos pela crotoxina irradiada, apesar de reconhecer a crotoxina nativa, foi ineficiente em neutralizar plenamente esta atividade. Esta neutralização parcial pode ser decorrente das alterações estruturais, resultantes da ação da irradiação, sugerindo que alguns determinantes, que antes encontravam-se expostos, foram mascarados (BARIDE *et al*, 1980; NASCIMENTO, 1991; GUARNIERI, 1992).

Na literatura foram descritos vários procedimentos para isolar imunoglobulinas (Ig), a partir do soro imune, com resultados diversos (CARROLL *et al*, 1992; MORAES *et al*, 1994; ROJAS *et al*, 1994; SJOSTROM *et al*, 1994). O protocolo adotado para o isolamento das imunoglobulinas, combinando as metodologias *salting-out* de precipitação com sulfato de amônia (PEROSA *et al*, 1990) e cromatografia de afinidade (YARMUCH *et al*, 1992) possibilitou a obtenção de um produto final de boa

qualidade. A técnica de eletroforese permitiu verificar que as IgGs alteradas, oriundas do processo de precipitação, e as demais proteínas séricas contaminantes foram eliminadas no processo de cromatografia (FERNANDEZ *et al*, 1991; ROJAS *et al*, 1994).

A detecção da crotoxina ou veneno crotálico circulante, em soro animais inoculados experimentalmente, foi possível utilizando ensaios de captura de antígenos, conforme relatado por diversos pesquisadores (AUDEBERT *et al*, 1992; BARRAL-NETO & SOHSTEN, 1991; CHAVEZ-OLORTEGUI *et al*, 1993; HENEINE & CATTY, 1993; DOMINGOS *et al*, 1994; TREVETT *et al*, 1995).

As técnicas aplicadas, ELISA e IRMA, utilizando os mesmos reagentes e soluções, com exceção do traçador, se mostraram capazes de detectar os antígenos. As curvas-padrão dos diferentes soros (SAVTI e SACXI) se apresentaram de modo semelhante para as duas técnicas utilizadas. Contudo, o ELISA foi mais sensível que o IRMA, na ordem de ng/ml (10^{-9} ml) contra a ordem de $\mu\text{g/ml}$ (10^{-6} ml). Porém, o tempo de ensaio do IRMA foi menor que o tempo de ensaio do ELISA. No IRMA, foi observado que o traçador radioiodado apresentou vida-útil curta (em torno de 3 meses), sendo portanto necessários gastos frequentes em processos de iodação, ao contrário do ELISA, cujo traçador enzimático apresentou alta estabilidade (acima de 1 ano).

Este fato também foi salientado por TAYLOR *et al* (1983), que compararam a sensibilidade, precisão e o tempo de ensaio, aplicados nas mesmas condições (soluções e reagentes) para as técnicas ELISA e

radioimunoensaio (RIA), e verificaram que o ELISA era mais sensível, todavia, o RIA foi mais preciso, e o tempo de ensaio foi menor.

A utilização dos soros antiveneno irradiado e anticrotoxina irradiada como primeiro anticorpo, provavelmente, incrementaram a especificidade das duas técnicas, visto que os dois soros pouco reagiram, quando testados frente ao veneno de *B. jararaca*.

Quanto a pesquisa de antígenos séricos da crotoxina e do veneno crotálico, pelas técnicas ELISA e IRMA, verificou-se que de modo geral, os níveis de antígenos circulantes aumentaram rapidamente durante os 15 minutos após inóculo, e que após a primeira hora após o inóculo, os valores encontrados decresceram rapidamente, até valores não detectáveis. Estes achados corroboram com dados encontrados por NASCIMENTO (1991) e BARRAL-NETO & SOHSTEN (1991), que verificaram que os níveis séricos de crotoxina decrescem rapidamente durante a primeira hora.

Os diferentes valores de concentração de antígenos, nos mesmos soros, detectados pelas diferentes técnicas, podem estar associados com as diferenças intrínsecas das mesmas. Estes estudos sugerem que, tanto o soro anticrotoxina irradiada quanto o soro antiveneno crotálico irradiado poderiam ser utilizados como reagentes em ensaios de detecção, quantificação e diferenciação dos acidentes com as serpentes *C. d. terrificus* e *B. jararaca*.

Portanto, a aplicação dos resultados obtidos no presente estudo justificam a utilização da radiação gama na destoxicação do veneno crotálico, com o intuito de aprimorar a soroprodução e produção de anticorpos de alta especificidade para fins de imunoenaios. Além disto, estes procedimentos podem ser aplicados em outros venenos e toxinas, com o intuito de aprimorar a produção de anti-soros e vacinas antivenenos e antitoxinas.

VI. CONCLUSÕES:

Neste estudo foi possível verificar que:

As toxinas irradiadas foram capazes de induzir a formação de altos níveis séricos de anticorpos.

Os anti-soros induzidos por toxinas irradiadas foram capazes de reconhecer as toxinas nativas de modo similar ao anti-soros induzidos por toxinas não irradiadas.

Anticorpos induzidos pelo veneno total crotálico irradiado foram mais eficientes que o anti-soro comercial na neutralização da atividade da fosfolipase A_2 da crotoxina *in vitro*.

Anticorpos induzidos pela crotoxina irradiada reagiram com o veneno homólogo, no entanto pouco reagiu com os venenos heterólogos testados, e, anticorpos antiveneno total irradiado reagiram com o veneno homólogo, e com menor intensidade os venenos heterólogos.

Na detecção de antígenos, o ensaio imunoenzimático ELISA foi mais sensível que o ensaio imunorradiométrico IRMA, que por sua vez precisou menos tempo de ensaio. Tanto os soros anticrotóxina irradiada e antiveneno crotálico irradiado, utilizados como reagente nos ensaios para detecção de antígenos séricos, foram eficientes reagindo plenamente o venenos crotálico e pouco reagindo com o veneno botrópico.

As curvas de cinética do veneno total e da crotóxina isolada mostraram que a primeira hora é crucial nos casos de envenenamento crotálico, sendo que, durante este período, o veneno sai do compartimento de inóculo para a corrente sanguínea, e por fim, para os órgãos-alvo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AIRD, S.D. & KAISER, I.I. - Comparative studies on three rattlesnakes toxins. *Toxicon* **23**: 361-74, 1985.

ANDERSON, S.G.; GUTIÉRREZ, J.M. & OWNBY, C.L. - Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. *Toxicon* **31** (8): 1051-9, 1993.

ANDRIANI, E.P. - Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas. São Paulo, 1995. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

ANICETTI, V.R.; FEHKENS, E.F.; REED, B.R.; CHEN, A.B.; MOORE, P.; GEIGER, M.D. & JONES, A.J.S. - Immunoassay for detection of *E. coli* proteins in recombinant DNA derivad human growth hormone. *J. Immunol. Methods* **91**: 213-24, 1986.

AUDEBERT, F.; SORKINE, M. & BON, C. - Envenoming by viper bites in France: clinical gradation and biological quantitation by ELISA. *Toxicon* **30** (5/6): 559-609, 1992.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A. & LAURE, C.J. - Myonecrosis, myoglobinuria and acuterenal failure

induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* **23**, 631-6, 1985.

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

BARRABIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C. & BARRIO, A. - Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosenberg, P. (ed.) - *Toxins: animals, plant and microbial*. New York, Pergamon Press, p. 133, 1978.

BARRAL-NETTO, M. & VON SOHSTEN, R.L. - Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance. *Toxicon* **29** (4/5): 527-31, 1991.

BARRAVIEIRA, B. - Acidentes por serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*. Em: Venenos Animais. Uma visão integrada. pp 281-95, EPUC - Editora de Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, 1994.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* **99**: 471-81, 1979.

BON, C.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. & FAURE, G. - Crotoxin: A biochemical analysis of its mode of action. *J. Toxicol. - Toxins Reviews* **5**: 438-48, 1986.

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**: 248-54, 1976.

BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, J. - Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* **24**: 273-82, 1984.

CARDI, B.A. - Estudo morfofisiológico comparativo de crotoxina nativa e irradiada em tecidos e células de camundongos CBA/J. São Paulo, 1995. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

CARROLL, S.B; THALEY, B.S.; THEAKSTON, R.D.G. & LAING, G. - Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms. *Toxicon* **30**: 1017-25, 1992.

CHAVEZ-OLORTEQUI, C.; LOPES, C.S.; CORDEIRO, F.D.; GRANIER, C. & DINIZ, C.R. - An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venom. *Toxicon* **31**: 417-25, 1993.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. & WHITE, J. - Snake venom variability methods of study, results and interpretation. *Toxicon* **29**: 1279-303, 1991.

CHOUMET, V.; JIANG, M.S.; SPECKER, I. & BON, C. - Immunochemical cross-reactivity of two phospholipase A₂ neurotoxins, agkistrodotoxin and crotoxin. *Toxicon* **29**: 441-51, 1991.

COSTA, L.M.; TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; BERRA, J.A.P.; ADELINO, M.G.F.; SOERENSEN, B.; PINTO, J.R. & VANCETTO, M.D.C. - Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, *in natura*, tratado com formaldeído, e submetido à ação térmica. *Vac. Soros* 1, 24-9, 1985.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUEZ, M.M.; MENEZES, J.B. & HERING, S.E. - Reações de hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 33 (2): 115-22, 1991.

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

DOMINGOS, M.O.; TAKEHARA, H.A.; LAING, G.; SNOWDEN, K.F. & SELLS, P.G. - Detection and neutralization of *Bothrops jararaca* venom in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 2613-22, 1994.

FAURE, G & BON, C. - Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 25: 229-34, 1987.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.L.; MONEGIER, B. & BON, C. - The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* 223, 161-4, 1994.

- 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**: 730-8, 1988.
- FERNANDES, I.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. - Isolation of horse IgG with protein A. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **24**: 1129-31, 1991.
- FLOWERS, H.H. - The effects of X-irradiation on the biological activity of Cotton Mouth Moccasin (*Agkistrodon piscivorus*) venom. *Toxicon* **1**, 131-6, 1963.
- FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. - Fractionation and composition of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **60**: 64-73, 1956.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. - Méthode permettant l'étude conjugué des propriétés électrophorétiques et immunochimique d'un mélange de protéines. Application au sérum antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta.* **10**: 193, 1953.
- GUARNIERI, M.C. - Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*. São Paulo, 1992. (Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- GUIDOLIN, R.; DIAS da SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; PINTO, J.R. & MARCELINO, J.R. - Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálicos tratados por glutaraldeído. *Mem. Inst. But.* **51**: 85-90, 1989.

- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E. & CERDAS, L. - An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* **26**: 411-3, 1988.
- HARLOW, E. & LANE, D. - In: *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Ed., U.S.A., 1988.
- HATI, R.N.; MANDAL, M. & HATI, A.K. - Active immunization of rabbit with gamma irradiated Russel's viper venom toxoid. *Toxicon* **28**(8): 895-902, 1990.
- HAWGOOD, B.J. - Crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Mem. Inst. Butantan* **52** (supl.): 21-2, 1990.
- HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**: 1560-3, 1971.
- HENEINE, L.D.G.; CATTY, D. & THEAKSTON, R.D.G. - Development of a specie-specific ELISA for brazilian pit-viper venoms. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **23**: 585-8, 1990.
- HENEINE, L.G.D. & CATTY, D. - Species-specific detection of venom antigens from snakes of the *Bothrops* and *Lachesis* genera. *Toxicon* **31**: 591-603, 1993.
- HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, 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 centros enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan* **51**: 107-15, 1989.

JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. - Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* **36** (2): 66-77, 1990.

JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. - Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **34**: 347-54, 1992.

KINI, R.M. & EVANS, H.J. - A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* **27**, 613-35, 1989.

KOCHOLATY, W.F.; GOETZ, J.C.; ASHLEY, B.D.; BILLINGS, T.A. & LEDFORD, E.B. - Immunogenic response of venoms of Fer-de-lance, *Bothrops atrox asper*, and La Cascabella, *Crotalus durissus terrificus*, following photooxidative detoxification. *Toxicon* **5**, 153-8, 1968.

KORNALÍK, F. & TÁBORSKÁ, E. - Cross-reactivity of mono and polyvalent antivenoms with Viperidae and Crotalidae snake venoms. *Toxicon* **27**, 1135-42, 1989.

LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5, 1970.

LI, Q. & OWNBY, C.L. - Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon* **30**: 1319-30, 1992.

MANDAL, M.; HATI, R.N. & HATI, A.K. - Neutralization of pathophysiological manifestations of Russel's viper envenoming by antivenom raised against gamma-irradiated toxoid. *Toxicon* **31**(2): 213-6, 1993.

- MANDAL, M.; HATI, R.N.; BARDHAN, D.K. & HATI, A.K. - Effect of gamma-irradiation on cobra (*Naja naja*) venom as a toxoid. *The Snake* **23**, 14-8, 1991.
- MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA: *Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento*. Secretaria de Estado da Saúde, Imprensa Oficial do Estado de São Paulo - IMESP, São Paulo, 1993.
- MIDDLEBROOK, J.L. - Cross-neutralizations of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. *Toxicon* **29**, 1481-7, 1991.
- MILES, L.E.M. & HALES, C.N. -Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **219**: 186-9, 1968.
- MORAES, J.F.; FREITAS, M.C.W.; YAMAGUCHI, I.K.; SANTOS, M.C. & DIAS DA SILVA, W. - Snake antivenoms from hiperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. *Toxicon* **32**: 725-34, 1994.
- MOROZ, C.; GOLDBLUM, N. & DE VRIES, A. - Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethylcellulose bound neurotoxin as antigen. *Nature* **200**: 697-8, 1963.
- MURATA, Y. - Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- NAKAZONE, A.K.; ROGERO, J.R. & GONÇALVES, J.M. - Crotoxin: Immunology and interation of the subunits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **17**: 119-28, 1984.

- NASCIMENTO, N. - Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação da crotoxina. São Paulo, 1995. (Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- NASCIMENTO, N. - Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos. São Paulo, 1991. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- OUCHTERLONY, O. - Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* **5**: 1-78, 1958.
- OWNBY, C.L. & COLBERG, T.R. - Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of several venoms of snakes in the family Crotalidae. *Toxicon* **28**: 189-99, 1990.
- PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S. & DAMMACCO, F. - Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulfate. *J. Immunol. Methods*. **128**, 9-16, 1990.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O. - Convulxin, a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* **19**: 875-87, 1981.
- PRADO-FRANCESCHI, J. - On the pharmacology of convulxin and gyroxin. *Mem. Inst. Butantan* **52** (supl.): 25-6, 1990.
- PURANANANDA, C. - Studies on effects of radiation on snake venoms with special aspects on their sterilization. I.A.E.A. - R - 661 - F, 1972.

- RIBEIRO, L.A.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; ALBUQUERQUE, M.J. & TAKAOKA, N.Y. - Acidente ofídico no Estado de São Paulo. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* **39**: 4-7, 1993.
- RIBEIRO, L.M. - Epidemiology of ophidic accidents. *Mem. Inst. Butantan* **52** (supl.): 15-6, 1990.
- ROGERO, J.R. - Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica hidrogênio-trício. São Paulo, 1978. (Dissertação de Doutorado, Instituto de Química USP).
- ROJAS, G.; JIMÉNEZ, J.M. & GUTIÉRREZ, J.M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* **32**: 351-63, 1994.
- 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.
- SEKI, C.; VIDAL, J.C. & BARRIO, A. - Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon* **18**: 235-47, 1980.
- SJOSTROM, L.; AL-ABDULLA, I.H.; RAWAT, S.; SMITH, D.C. & LANDON, J. - A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon* **32**: 427-33, 1994.
- SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* **12**: 505-13, 1938.

SOUZA-FILHO, J.N.; GUARNIERI, M.C.; MURATA, Y. & ROGERO, J.R. - Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **25**: 103-13, 1992.

TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M. & ADELINO, M.G.F. - Fracionamento do veneno *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **27** (3): 115-22, 1985.

TAN, N.H.; CHOY, S.K.; CHIN, K.M. & PONNUDURAI, G. - Cross-reactivity of monovalent and polyvalent *Trimeresurus* antivenoms with venoms from various species of *Trimeresurus* (lance-headed pit viper) snake. *Toxicon* **32**: 849-53, 1994.

TAYLOR, F.G.R.; PATEL, D. & BOURNE, F.J. - Comparison of sensitivities of ELISA and Radioimmunoassay for detection of class-specific antibody in mouse serum. *J. Immunol. Methods* **65**: 65-73, 1983.

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

THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J. & REID, H.A. - Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *The Lancet* **24**: 639-41, 1977.

THEAKSTON, R.D.G. - The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to snake venom research. *Toxicon* **21** (3): 341-52, 1983.

- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T. & GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyarilamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4, 1979.
- TREVETT, A.J.; LALLOO, D.G.; NWOKOLO, N.C.; THEAKSTON, R.D.G.; NARAQI, S. & WARRELL, D.A. - Venom detection kits in the management of snakebite in Central Province, Papua New Guinea. *Toxicon* **33**: 703-5, 1995.
- VITAL-BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan* **33**: 991-2, 1966.
- VITAL-BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Ass. Med. Brasil.* **26** (6): 212-7, 1980.
- VITAL-BRAZIL, O. - Pharmacology of crotamine. *Mem. Inst. Butantan* **52** (supl.): 23-4, 1990.
- W.H.O. - BULLETIN OF WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms.* Geneva, 1981.
- YANG, C.C. - Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J. Toxicology - Toxin Reviews* **13**: 125-77, 1994.
- YARMUSH, M.L.; WEISS, A.M.; ANTONSEN, K.P.; ODDE, D.J. & YARMUSH, D.M. - Immunoaffinity purification: basic principles and operational considerations. *Biotech. Adv.* **10**: 413-46, 1992.

ANEXO 1. Cálculo da DL₅₀.

Determination of Median Lethal Dose. The details of the test are as follows:
The method of calculating the LD₅₀ should be by a statistically sound method, such as probit analysis or the Spearman-Kärber method.

Animals: mice

Route of injection: intravenous

Volume of injection: 0.2 ml

Rate of injection: the 0.2 ml given ip 15 seconds

Expression of results: the 50% lethal dose (LD₅₀) is expressed in micrograms of venom per mouse

Dilution of venom: the dilution series of the venom will be such that at least 3 dilutions fall on the steep part of the dose-response curve

Number of animals: at least 5 animals are inoculated with each dilution of venom

Period of observation: the mice will be observed for 48 hours

Controls: 5 mice injected with saline as controls must survive The injection.

Calculation of ~LD₅₀:

The LD₅₀ of each venom may be calculated by the Spearman-Kärber method, which is valid provided:

- d = the log dose interval is constant;
- the full response range from 0 to 100% is covered; and
- the response distribution is nearly symmetrical.

Then,
$$m = x_{100} \pm \frac{d}{n} \left(\sum \frac{r-n}{2} \right)$$

where: $m = \log LD_{50}$

x_{100} = log dose giving 100% deaths and having 100% deaths for all higher doses

n = number of mice used at each dose level

r = number of mice dying at each dose level

Σ = summation over all doses between and including x_{100} and x_0 (x_0 being defined as the log dose giving no one deaths and having no one deaths for all lower doses)

Calculation of fiducial limits for the LD₅₀:

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

Where Σ denotes summation over the same range as in the previous paragraph. The 95% fiducial limits to m are taken to be approximately $m \pm t_{0.05} \sqrt{V(m)}$ has the value appropriate for $\Sigma(n-1)$ degrees of freedom, the summation in this case extending only over those dose levels giving death rates other than 0 and 100%.

There is no difference between the results obtained by injecting venom doses exactly corresponding to the individual body-weight of each mouse and those produced by inoculating mice with a common dose corresponding to the average weight of the specimens in the lot (Schöttler, W. H. A. *Bulletin of the World Health Organization* 19: 341, 1958).

Ref: *Bull. W.H.O.* - Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva, 1981, pp23-4.