



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS DO
VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*
IRRADIADO COM ^{60}Co**

PATRICK JACK SPENCER

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

Orientador:
Dr. José Roberto Rogero

**São Paulo
1995**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de
Bothrops jararacussu irradiado com ^{60}Co .**

Patrick Jack Spencer

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

Orientador: Dr José Roberto Rogero

São Paulo
1995



Dedico este trabalho a meus pais e a todos aqueles que me incentivaram e apoiaram.

AGRADECIMENTOS

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

A amiga Nanci sem a qual não teria surgido a oportunidade de desenvolver este trabalho e, claro, pelo grande carinho e amizade.

A Dra Judith Klotzel por ter me iniciado na carreira científica.

A Ana Cláudia pela atenção e carinho nos momentos difíceis.

Ao amigo Johnny, companheiro de HPLC madrugadas adentro.

A Regina pela colaboração em muitas etapas deste trabalho.

A Monica pela paciência e amizades dispensadas.

A Yoko pelas dicas, palpites e sugestões.

Ao Chico pela imensa paciência e amizade.

A Teresa pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Paolo Bartolini pelo incentivo e empréstimo das colunas.

Aos amigos Calixto e Cícero, sempre prestativos e atenciosos.

A Maria Helena pela amizade e atenção dispensadas.

A Tânia pelo carinho apoio e amizade.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pelas sugestões e empurrões nas horas certas.

Ao amigo Bruno, pelas sempre frutuosas discussões e sugestões.

Ao amigo Carlão que sempre tem tampão quando o nosso acaba.

A Lígia pela calma e paciência com os "moleques".

A amiga Míriam por ter me iniciado nos estudos venenosos.

A amiga Ieda pela paciência e carinho.

A Nice pela amizade e apoio.

Em especial ao grupo de venenos pela cooperação, amizade e apoio.

A todo pessoal do TB pela amizade e apoio.

E a todas as pessoas que, imperdoavelmente, eu possa ter esquecido.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* IRRADIADO COM ^{60}Co .

Patrick Jack Spencer

Resumo

A irradiação de proteínas leva a alterações estruturais, acarretando perda de atividade e função das mesmas. Este processo tem se mostrado útil para destoxicar venenos e toxinas animais, resultando em produtos de baixa toxicidade, com aumento de sua imunogenicidade. O veneno de *Bothrops jararacussu* se comporta como um imunógeno fraco e sua atividade letal não é bloqueada de modo eficiente pelo anti-soro homólogo, tampouco por anti-soros heterólogos ou botrópico polivalente. Este veneno se destaca pela sua ação miotóxica. O anti-soro botrópico comercial é ineficiente na neutralização desta atividade, fato atribuído a uma baixa imunogenicidade dos componentes responsáveis por esta ação. O presente trabalho teve por objetivo estudar a viabilidade de se irradiar o veneno de *Bothrops jararacussu*, visando-se aumentar a imunogenicidade dos componentes miotóxicos, levando à produção de anticorpos neutralizantes desta atividade. Amostras de veneno de *Bothrops jararacussu* foram irradiadas com as doses de 500, 1000 e 2000 Gy em uma fonte de cobalto 60. A toxicidade das amostras decresceu 2,3 vezes com a dose de 1000 Gy e mais de 3,7 vezes para a dose de 2000 Gy, sendo 500 Gy insuficientes para promover decréscimo da atividade tóxica. As análises por eletroforese e em HPLC indicaram que a irradiação leva à formação de produtos de alto peso molecular (agregados). As atividades proteolítica e fosfolipásica decresceram em função da dose, mostrando-se as fosfolipases mais radiorresistentes. Os animais imunizados com o veneno nativo ou irradiado com 2000 Gy produziram anticorpos capazes de se ligar ao veneno nativo, sendo que o animal imunizado com veneno irradiado apresentou um título ligeiramente superior. Os dados de western blot mostraram que o soro obtido do animal imunizado com veneno irradiado reconheceu uma quantidade maior de bandas do que aquele do animal que recebeu veneno nativo, tanto no veneno autólogo quanto em outros venenos botrópicos, mostrando-se ambos os soros gênero-específico. O soro anti-nativo se mostrou ineficiente para neutralizar a miotoxicidade do veneno nativo, enquanto o soro anti-irradiado inibiu esta atividade.

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS OF ^{60}Co
IRRADIATED *Bothrops jararacussu* VENOM.

Patrick Jack Spencer

Abstract

Proteins irradiation leads to structural alterations, resulting in activity and function loss. This process has been useful to detoxify animal venoms and toxins, resulting in low toxicity products with increased immunogenicity. The *Bothrops jararacussu* venom behaves as a weak immunogen and its lethal activity is not neutralized by either autologous, heterologous or bothropic polyvalent antiserum. This venom is markedly myotoxic and the commercial bothropic antiserum does not neutralize this activity, because of the low immunogenicity of the myotoxins. The present work was done in order to evaluate the possibility of irradiating *Bothrops jararacussu* venom, intending to increase the immunogenicity of the myotoxic components, leading to production of myotoxins neutralizing antibodies. *Bothrops jararacussu* venom samples were irradiated with 500, 1000 and 2000 Gy of ^{60}Co gamma rays. A 2.3 folds decrease of toxicity was observed for the 1000 Gy irradiated sample while the 2000 Gy irradiated sample was at least 3.7 folds attenuated. On the other hand, the 500 Gy dose did not promote any detoxification. Electrophoresis and HPLC data indicate that the irradiation led to the formation of high molecular weight products (aggregates). The proteolytic and phospholipase activities decreased in a dose dependent manner, the phospholipases being more resistant than the proteases. Both the animals (rabbits) immunized with either native or 2000 Gy irradiated venom produced native venom binding antibodies, a slightly higher titer being obtained in the serum of the rabbit immunized with the irradiated samples. Western blot data indicate that the anti-irradiated venom IgGs recognized a greater amount of either autologous or heterologous venom bands, both sera behaving as genus specific. The anti-native serum did not neutralize the myotoxic activity of native venom, while the anti-irradiated one was able to neutralize this activity.

SUMÁRIO

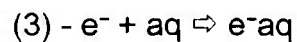
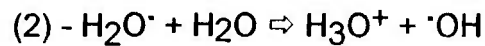
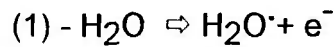
<i>Introdução</i> _____	1
<i>Objetivos</i> _____	11
<i>Material e métodos</i> _____	12
Irradiação do veneno: _____	12
Dosagem de proteínas: _____	12
Atividade tóxica: _____	13
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): _____	13
Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) : _____	14
Atividade fosfolipásica : _____	15
Atividade proteolítica sobre caseína: _____	16
Imunização dos coelhos : _____	17
Ensaio Imunoenzimático (ELISA): _____	18
Imunotransferência (Western Blot): _____	19
Neutralização da miotoxicidade: _____	20
<i>Resultados e discussão</i> _____	21
Irradiação do veneno: _____	21
Atividade tóxica: _____	22
Análise eletroforética: _____	23
Análise cromatográfica em HPLC: _____	25
Atividade fosfolipásica : _____	33
Atividade caseinolítica: _____	34
Imunização dos animais e titulação dos anticorpos: _____	36
Western blot: _____	38
Neutralização da atividade miotóxica _____	40
<i>Conclusões</i> _____	43
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> _____	44

Introdução

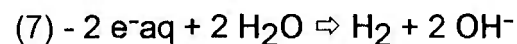
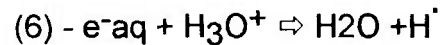
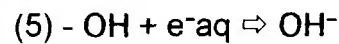
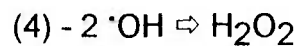
A passagem de uma partícula ou fóton pela eletrosfera de um átomo pode provocar excitação ou ionização deste, dependendo da energia cinética do fóton. Na excitação, o elétron adquire energia do fóton, passando para um nível quântico superior, permanecendo em órbita ao redor do núcleo. Na ionização, a energia adquirida pelo elétron é suficiente para que ele seja projetado da eletrosfera, ionizando o átomo. Como resultado desta ionização, o átomo passa a ter um elétron desemparelhado em um de seus orbitais superiores, tornando-se altamente reativo. Em consequência da reatividade do radical livre assim formado, este tem meia vida curta e, em picossegundos, combina seu elétron desemparelhado com um elétron de outro átomo, ejeta seu elétron ou ainda, captura um elétron de outro átomo. Cada uma dessas interações pode gerar íons ou radicais livres adicionais e a maioria dos efeitos da radiação em moléculas orgânicas em solução decorre da interação destas com radicais livres provenientes da radiólise do solvente ⁴.

A água é a molécula mais abundante em sistemas biológicos; logo, se quisermos investigar os efeitos da radiação ionizante em sistemas biológicos, teremos de considerar os efeitos da radiação na molécula de água.

A irradiação da água pura ou de soluções diluídas gera espécies moleculares e radicais livres conforme as seguintes equações:



A seguir, estas espécies podem reagir entre si segundo as equações abaixo:



A irradiação de proteínas em solução aquosa causa mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias, secundárias e terciárias das moléculas protéicas. Estas mudanças envolvem perda de atividade biológica e possíveis alterações nas propriedades imunológicas.

A inativação das moléculas protéicas decorrente da irradiação em solução pode se dar de duas maneiras:

-efeito direto: quando a ionização ocorre na molécula do soluto.

-efeito indireto: quando a molécula do soluto reage com os produtos da interação da radiação com o solvente.

Com radiações cujas partículas depositam em média menos de 1eV/nm de percurso (raios γ de ^{60}Co , raios X de alta energia, elétrons de 2 Mev) a maioria das ionizações é isolada de maneira que OH^\cdot e e^-_{aq} são as espécies principais ⁴ quando a irradiação ocorre em solução aquosa. Estas espécies são respectivamente poderosos agentes oxidantes e redutores. Os radicais OH^\cdot reagem com uma velocidade relativamente baixa com aminoácidos de cadeia lateral curta ($K \sim 10^7 - 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), sendo a principal reação a abstração de um H do grupamento $\alpha\text{C-H}$ ⁴. Esta constante de velocidade (K) aumenta com os aminoácidos aromáticos (p.e. $K = 1,2 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o triptofano) onde as reações ocorrem principalmente no anel ⁴. Os radicais OH^\cdot produzem reações complexas com a metionina dando origem a radicais catiónicos. Com a cisteína, a abstração do H do grupamento S-H produz, em primeira instância, o radical RS^\cdot que pode reagir posteriormente para formar radicais do tipo RSSR ⁴ podendo levar a formação de pontes S-S intra e inter-cadeias.

Como se pode ver, os tipos de radicais produzidos pela reação do radical hidroxila com aminoácidos são extremamente diversos .

O elétron aquoso desamina aminoácidos de cadeia lateral curta como a glicina ou a alanina com velocidades da ordem de $10^6 - 10^7 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; reage com arginina e os aminoácidos aromáticos com constantes de velocidade de $10^8 - 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com histidina com velocidades da ordem de $10^9 - 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Assim, a reatividade é determinada pela natureza da cadeia lateral ⁴.

Todavia, o estado de protonação do grupamento amino-terminal também é relevante; com efeito, com a glicina, por exemplo, a velocidade de reação é de $\sim 8 \times 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ em pH 6, quando o grupamento amina está protonado, enquanto em pH 12, quando a amina está desprotonada a velocidade é de apenas $2 \times 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Os elétrons aquosos reagem com peptídeos de uma maneira muito mais rápida do que com aminoácidos isolados devido a eletrofilicidade da ligação peptídica.

A perda de atividade biológica das proteínas irradiadas em solução têm sido atribuída a alterações químicas de alguns aminoácidos em seu centro ativo, a quebras de pontes dissulfeto, mudanças conformacionais devido a distúrbios nas pontes de hidrogênio e a ligações cruzadas ou cisões na cadeia polipeptídica. Também são relevantes as reações de abstração de átomos de hidrogênio, dissociativas, de adição, dimerização e adição, desprotonação, hidrólise, adição de oxigênio e transferência de hidrogênio. Dentre as propriedades biológicas, as propriedades antigênicas parecem ser as mais radorresistentes¹⁷, possibilitando o uso da radiação gama para induzir destoxicação de diversas toxinas isoladas ou venenos com manutenção das propriedades antigênicas e imunogênicas.

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90%); em sua maioria toxinas ou enzimas com atividade tóxica, carboidratos, lipídeos, amins biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos peptídeos e componentes inorgânicos^{3, 12}.

Os venenos botrópicos, em particular, apresentam uma grande variedade de enzimas: fosfolipases A₂, L-aminoácido-oxidases, hialuronidasas, cininogênicas, enzimas trombina-símile, ativadoras de fator X e protrombina, além de várias esterases, endopeptidasas e fosfatases^{12, 23}.

Embora estes venenos sejam extremamente complexos e heterogêneos quanto à sua composição^{6, 16}, seus efeitos são característicos.

Os venenos botrópicos induzem um quadro patofisiológico caracterizado por:

- Dano tecidual local (mionecrose, hemorragia e edema)¹⁹,
- Alterações cardiovasculares, em particular choque hipovolêmico e hemorrágico¹,
- Alterações na cascata da coagulação (desfibrinação)³⁶,
- Alterações renais que podem evoluir para insuficiência renal aguda¹,

Segundo Selistre e cols⁵², a patogênese das lesões locais pode ser atribuída primariamente às atividades de proteases, fosfolipases, fatores hemorrágicos e, secundariamente à liberação de agentes vasoativos.

Além dos efeitos locais, os venenos botrópicos são capazes de induzir, após sua absorção, hemorragia em vários tecidos e órgãos^{1, 42}. As toxinas hemorrágicas são diretamente responsáveis pelo sangramento local e sistêmico²⁴. Estas podem ser definidas como enzimas proteolíticas de alta especificidade pelo substrato^{45, 51, 56}, que exercem sua ação sobre fibrinogênio e colágeno.

A maioria dos venenos exibe, simultaneamente, mais de um tipo de ação sobre a coagulação sangüínea:

- (1) conversão do fator X em fator X ativado;
- (2) conversão de protrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta);
- (3) conversão de protrombina em trombina na presença de fator V (ativação indireta) e
- (4) conversão de fibrinogenio em fibrina (atividade trombina-símile) ^{1, 10, 11, 38, 44}.

Embora os venenos botrópicos sejam coagulantes *in vitro*, suas atividades promovem o consumo de fatores da coagulação, principalmente o fibrinogenio, e ativam o sistema fibrinolítico, causando *in vivo*, incoagulabilidade sangüínea ^{1, 27, 48}. Com a ativação do fator X ocorre consumo dos fatores V, VIII e plaquetas, podendo levar a um quadro de coagulação intravascular disseminada e a deposição de microtrombos na parede capilar, que poderiam contribuir para o desencadeamento da insuficiência renal aguda ^{1,25}. Os distúrbios na coagulação sangüínea podem também agravar as alterações hemorrágicas locais e sistêmicas ¹.

Alguns efeitos do envenenamento botrópico, como indução de edema e necrose, são decorrentes da ação conjunta de enzimas proteolíticas, hemorrágicas, coagulantes e de outras proteínas farmacologicamente ativas ^{19, 42}.

O edema é relevante do ponto de vista clínico ¹, tanto pela sintomatologia apresentada no envenenamento, quanto pela dificuldade de neutralizá-lo *in vitro* ^{20, 50}; e *in vivo* (Guarnieri, M.C. comunicação pessoal). Segundo Gutierrez e Lomonte ¹⁹, este efeito pode ser atribuído à ação conjunta de : toxinas hemorrágicas; toxinas que aumentam a permeabilidade vascular, fosfolipases ou citotoxinas que induzem a degranulação de mastócitos; fosfolipases A₂, que atuam nos fosfolípidos de membrana, acarretando a liberação de ácido araquidônico, iniciando a via que leva à síntese de prostaglandinas; leucotrienos e PAF; C3a e C5a, anafilatoxinas resultantes da ativação da via alternativa do sistema complemento; e proteinases que tem como substratos os cininogênios plasmáticos, liberando bradicininas.

O tratamento do envenenamento é feito por soroterapia, sendo o anti-soro produzido em equinos imunizados com um pool de venenos nativos. O imunógeno utilizado constituiu-se de uma mistura dos cinco venenos botrópicos epidemiologicamente mais relevantes : 40% de veneno de *B. jararaca*, sendo os outros 60% constituídos de 20 % de veneno de *B. alternatus*, 13,3% de *B. jararacussu*, 13,3% de *B. moojeni* e 13,3% de *B. neuwiedi*.

Os anticorpos induzidos por este pool são eficientes na neutralização da maior parte dos componentes dos venenos botrópicos, todavia alguns componentes dos mesmos são espécie-específicos, não sendo eficientemente neutralizados pelo anti-soro polivalente ³⁵.

Estes antígenos são compostos de baixo peso molecular (14-18 Kd) com atividade miotóxica ³⁵. Frente aos venenos com atividade miotóxica, a soroterapia é eficiente na neutralização dos efeitos sistêmicos, mas ineficiente na neutralização dos danos teciduais resultantes da ação do componente miotóxico. Cabe ressaltar que em grande número de envenenamentos, a não neutralização dos efeitos locais resulta em seqüelas permanentes, isto é, perda de tecidos ¹⁹.

As miotoxinas podem ser consideradas como fatores evolutivos que aparecem somente em alguns gêneros e espécies ³⁵.

A importância dos anticorpos antimiotoxinas foi demonstrada no tratamento da mionecrose induzida pelo veneno de *Crotalus viridis viridis*: anticorpos antimiotoxina foram mais eficientes que soros polivalentes na neutralização do efeito lesivo ⁴⁶.

Este fato também foi constatado com os venenos botrópicos miotoxina positivos, com efeito, o soro antibotrópico-crotálico se mostrou mais eficaz na neutralização das principais atividades do veneno de *B. jararacussu*, quando comparado com o anti-soro botrópico ¹⁴.

Esta maior proteção conferida pelo anti-soro botrópico-crotálico pode ser atribuída a uma melhor neutralização dos dois componentes capazes de induzir uma lesão muscular: o fator hemorrágico que é bem neutralizado pelos dois anti-soros e o miotóxico que pode estar sendo reconhecido imunologicamente pelos anticorpos antifosfolipase A₂ (PLA₂) presentes no anti-soro botrópico-crotálico ¹⁴.

Moura da Silva e cols ³⁵ sugerem a inclusão de venenos miotóxicos ou de miotoxinas purificadas no pool de antígenos usados para a produção de soros antibotrópicos no intuito de torná-lo mais eficiente na neutralização da atividade miotóxica.

Contudo, o pool de venenos utilizados na produção do anti-soro já contém venenos com esta atividade (*B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*), podendo se atribuir a baixa proteção conferida pelos anticorpos gerados a uma baixa imunogenicidade destas miotoxinas. A inclusão no pool de uma miotoxina mais antigênica e com a toxicidade atenuada permitiria a produção de um anti-soro com maior capacidade neutralizante.

O veneno de *B. jararacussu* é miotóxico, causando necrose de fibras musculares e retardando a sua regeneração ^{14, 47}. Este veneno, quando injetado pela via intramuscular em ratos, induz uma maior liberação de creatina quinase, quando comparado com outros venenos botrópicos ^{14, 33}. O veneno de *B. jararacussu* se comporta como um imunógeno fraco ^{13, 35}, e sua atividade letal não é bloqueada de modo eficiente pelo anti-soro homólogo, tampouco por anti-soros heterólogos ¹³ ou botrópico polivalente ¹⁴.

Foram isoladas proteínas com atividade PLA₂ desse veneno ^{22, 57}, dentre as quais uma apresentou atividade miotóxica ²². Foi isolada também uma proteína termo-estável com homologia estrutural com a PLA₂, sem atividade enzimática, mas com potente atividade miotóxica, denominada bothropstoxina ²². Esta proteína básica, (P.I.=8.2) apresenta peso molecular de 13.720 dalltons ⁷, 14 resíduos de 1/2 cistina, sugerindo a existência de 7 pontes dissulfeto ⁷ e representa 15% das proteínas totais do veneno ²².

A ausência de atividade fosfolipásica desta proteína, apesar de sua grande homologia com enzimas desta classe, pode ser atribuída à substituição do ácido aspártico 49 por um resíduo de lisina ⁷. Sabe-se hoje que este domínio da proteína corresponde ao sítio de ligação de Ca^{++} do qual depende a atividade da enzima ¹⁵. Estas alterações evolutivas na estrutura primária da proteína resultaram em uma molécula PLA₂-símile, porém desprovida desta atividade, que apresenta especificidade para tecido muscular e capacidade de lesar o mesmo.

A inclusão do veneno total de *B. jararacussu*, modificado pela radiação, de forma a apresentar maior imunogenicidade da fração miotóxica e baixa toxicidade, no pool de antígenos empregados na imunização dos animais soroprodutores, resultaria na formação de anticorpos capazes de neutralizar não só a atividade miotóxica deste veneno, assim como aquela de venenos miotóxicos de outras serpentes (Kaiser, I. comunicação pessoal), sem acarretar o aparecimento do efeito lesivo que o veneno na sua forma nativa induz.

Vários processos vêm sendo testados com o objetivo de destoxicar os venenos ofídicos e suas frações, preservando sua imunogenicidade, incluindo tratamento com formaldeído ⁸, fotooxidação na presença de azul de metileno ²⁶, adsorção com tanino ⁴³ e iodação ²¹.

A maioria dos métodos estudados não foi eficaz na combinação de altos níveis de destoxicação e manutenção ou aumento da imunogenicidade, todavia, a irradiação com raios gama tem se mostrado uma solução promissora, tendo apresentado bons resultados na destoxicação do veneno de serpentes de várias espécies ^{2, 9,17, 39,40,41}.

Objetivos

Com o presente projeto pretende-se:

1-Determinar a dose de radiação mais eficiente em promover decréscimo da toxicidade do veneno total de *Bothrops jararacussu* associada à indução de anticorpos neutralizantes da atividade miotóxica.

2-Estudar as principais modificações responsáveis pela alteração das características imunológicas das proteínas do veneno.

Material e métodos

Irradiação do veneno:

Amostras de veneno de *B.jararacussu* sêco e na forma cristalina, cedido pelo Instituto Butantan foram diluídas para uma concentração protéica final de 2 mg/ml em NaCl 150 mM. A seguir, estas amostras foram submetidas a irradiação em uma fonte de cobalto 60 a temperatura ambiente e na presença de oxigênio com doses de 500, 1000 e 2000 Gy, conforme descrito por Murata³⁷. Para cada dose, foi feito um controle, consistindo de uma alíquota de veneno nas mesmas condições(com exceção da radiação).

Dosagem de proteínas:

A concentração protéica das amostras foi avaliada pelo método de Lowry³¹, modificado por Miller³⁴. Para cada dosagem foi construída uma curva padrão com albumina bovina, sendo todos os pontos duplicatas, e a partir destes pontos calculou-se a regressão linear da reta Concentração X Absorvância. A dosagem das amostras foi feita em triplicata com duas diluições e a concentração foi calculada como sendo a média das concentrações extrapoladas a partir da equação da reta multiplicadas pelos respectivos fatores de diluição.

Atividade tóxica:

A toxicidade do veneno nativo e irradiado nas diversas doses foi determinada pelo método da dose letal 50% (DL₅₀) calculada pelo método de Spearman-Kärber, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde ⁵⁸. Os ensaios foram realizados em camundongos Swiss, machos, com peso de 20±2g divididos em grupos de 5 animais por dose e o veneno foi inoculado em doses decrescentes (fator de diluição =1,3), partindo de uma concentração inicial de 300 µg/animal, pela via intraperitoneal. A mortalidade dos animais foi acompanhada por 48 horas, sendo os sobreviventes sacrificados com éter.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Amostras de veneno nativo e irradiado nas várias doses foram submetidas a separação em gel de poliacrilamida (15%) na presença de sódio dodecil sulfato em sistema descontínuo, conforme descrito por Laemmli ²⁹. Foram aplicados 40 µg de amostra por poço e procedeu-se à corrida fixando-se a corrente em 20 mA. A seguir o gel foi corado com Coomassie Blue 250 R. Em ambos os lados do gel foram aplicados padrões de peso molecular conhecido (soralbumina bovina, ovalbumina, inibidor da tripsina de soja e alfa lactalbumina).

Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) :

Após previa padronização do método, o veneno irradiado nas diversas doses foi submetido a cromatografia de exclusão molecular em um sistema Waters equipado com uma coluna Toso-Haas TSK G-2000 SW (600x7,5 mm), precedida de uma pré coluna de exclusão molecular Shodex W-800 P (waters) . A fase móvel utilizada foi bicarbonato de amônio 25mM pH 7,5 e o fluxo foi de 1 ml/min. A absorvância do eluído foi determinada a 220 nm e as áreas dos picos calculadas em um integrador Waters modelo 746. Foram injetados 20 µl de cada amostra, correspondendo a 40 µg de proteína, por corrida e cada análise foi feita em triplicata.

Atividade fosfolipásica :

A atividade fosfolipásica do veneno nativo e das amostras irradiadas foi comparada através do método da hemólise em placa conforme descrito por Gutierrez e col.¹⁸. Introduzimos uma pequena modificação ao método, substituindo as hemáceas de carneiro por hemáceas de camundongo. Ensaio de padronização do método mostraram que esta modificação em nada alterava a sensibilidade do método para o veneno de *B. jararacussu*. Em resumo, placas de vidro foram recobertas com o gel descrito a seguir :

Gema de ovo diluída 1:4 em PBS: 0,25 ml

Hemáceas de camundongo frescas: 0.3 ml

CaCl₂ 10 mM : 0,25 ml

Agarose 0,8 % em PBS:q.s.p.. 25 ml

Uma vez solidificado o gel, foram feitos 10 furos no mesmo ($\varnothing=2$ mm). A seguir, aplicou-se amostras de veneno nativo ou irradiado, em duplicata, num volume de 10 μ l e na concentração de 30 μ g/ml em PBS . Estas placas foram então incubadas a 37° C por 20 horas em câmara úmida. Decorrido este tempo, procedeu-se a medida dos halos de hemólise . Como controle negativo, aplicou-se PBS em dois poços.

Atividade proteolítica sobre caseína:

A atividade caseinolítica das amostras foi determinada através do método descrito por Kunitz²⁸, modificado por Lomonte e cols.³⁰.

Um ml das amostras do veneno nativo ou irradiado com várias doses, na concentração de 200 µg/ml foi incubado com 1 ml de caseína a 1% em PBS a 37° C por 30 minutos. A seguir a reação foi interrompida com a adição de 4ml de ácido tricloroacético 5 % e a mistura foi centrifugada a 4500 rpm em centrifuga refrigerada. A densidade óptica do sobrenadante foi então determinada a 280 nm. Como controle, foi utilizado o mesmo procedimento acima, omitindo-se o veneno da solução. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Imunização dos coelhos :

Dois coelhos machos, com três meses de idade providos de água e comida *ad libitum*, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram imunizados com veneno nativo ou irradiado com 2000 Gy, consistindo o primeiro inóculo de 500 μg de veneno nativo ou irradiado em adjuvante de Freund completo, o segundo, após 15 dias, da mesma quantidade de antígeno em Freund incompleto. Decorridos 15 dias do segundo inóculo, aplicou-se a mesma quantidade de veneno acima referida em PBS . Todas as injeções foram feitas utilizando-se a via intradérmica. Por fim foi aplicado um reforço, consistindo de 50 μg de veneno em PBS pela via intramuscular. Decorridos 5 dias do inóculo do reforço, colheu-se sangue de ambos os animais através de punção cardíaca sob anestesia . Imediatamente após a coleta, o sangue foi incubado a 37° C por 30 minutos para retração do coágulo e centrifugado a 2000 rpm em centrífuga refrigerada por 10 minutos, colhendo-se então o sobrenadante.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA):

Sensibilizou-se uma placa de microtitulação com veneno nativo (10 μ g/ml em tampão carbonato pH 9,6) . A seguir, após bloqueio da placa com soroalbumina bovina a 1% em PBS, adicionou-se o soro dos animais soroprodutores, em diluições sucessivas com fator 1:2 partindo de uma diluição inicial de 1:400. O controle negativo foi feito com soro dos animais colhido antes da imunização. Foram feitos também controles do conjugado. Após 4 lavagens, adicionou-se IgG anti IgG de coelho marcada com peroxidase 1:4000 (Sigma) incubando-se a placa por mais uma hora. Após mais 4 lavagens, adicionou-se água oxigenada, substrato da peroxidase, e ortofenileno-diamina como cromogênio, deixando a mistura reagir 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ l de citrato 2 M. A densidade óptica das amostras foi determinada em um leitor de microplacas Dynatech a 450 nm. Todas as diluições foram feitas em quadruplicata, assim como os controles.

Imunotransferência (Western Blot):

Foram aplicados 40 μ l de veneno total nativo, correspondendo a 32 μ g de proteínas, dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 sódio dodecilsulfato 1%) em um gel de poliacrilamida a 15%. Procedeu-se à separação eletroforética dos componentes das amostras utilizando uma corrente fixa de 15 mA e voltagem variável. Finda a corrida, procedeu se a transferência das proteínas assim separadas para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 μ em sistema semi-sêco segundo a metodologia descrita por Towbin & Gordon ⁵⁵. A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% em PBS e incubou-se a mesma com anticorpos antiveneno total irradiado ou antiveneno total nativo diluído 1:200 em PBS. As bandas foram reveladas com IgG anti IgG de coelho conjugada a peroxidase diluída 1:2000 em PBS, H₂O₂ , diamino benzidina e cloreto de cobalto como "enhancer".

Neutralização da miotoxicidade:

Grupos de 10 camundongos Swiss, machos, com peso entre 25 e 28g foram inoculados pela via intramuscular com PBS (controle negativo), 25 µg de veneno total nativo (controle positivo), 25 µg de veneno total nativo adicionado de 15µl de soro antiveneno total nativo diluído 1:10 ou 25 µg de veneno total nativo adicionado de 15µl de soro antiveneno total irradiado na mesma diluição. Após a adição do diluente ou dos antissoros, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos antes do inóculo. Ocorrendo o pico de liberação de creatina-quinase entre a terceira e sexta hora após o inóculo do veneno ¹⁴, optamos por coletar o soro dos animais 3,5 horas após o inóculo. A sangria dos animais foi realizada pelo plexo retrorbital, sob anestesia. O sangue colhido foi imediatamente centrifugado, retirando-se o soro. Este soro foi recentrifugado para remoção de eventuais células ainda presentes e o sobrenadante foi então congelado a -70°C até a hora do uso. A seguir a enzima foi dosada por meio do kit para creatina-quinase CK-nac MERCK seguindo as recomendações do fabricante a 25°C e 340 nm.

Resultados e discussão

Irradiação do veneno:

O processo de irradiação, diferentemente do que ocorre com veneno crotálico³⁷, ou crotoxina isolada^{39,54}, não resultou no aparecimento de precipitados, mesmo quando se analisou a amostra submetida à dose de 2000 Gy. Também não foi observada variação na concentração protéica de quaisquer das amostras analisadas. Do mesmo modo, Guarnieri-Cruz¹⁷, estudando os efeitos da radiação em veneno de *B. jararaca* não observou precipitação nas amostras irradiadas. Este fato pode ser atribuído a diversidade de componentes do veneno: é sabido que ao se irradiar misturas protéicas em solução, os danos sofridos pelas moléculas são menores que ao se irradiar os componentes em separado pois as diversas moléculas presentes na mistura desempenham um papel protetor uma em relação a outra⁵³. Assim, misturas protéicas complexas seriam menos sensíveis aos efeitos da radiação que proteínas puras ou misturas com poucos componentes, como é o caso do veneno crotálico.

Atividade tóxica:

Conforme podemos observar na tabela abaixo, a irradiação levou a atenuação progressiva da toxicidade do veneno num processo dose dependente. A dose de 500 Gy não promoveu qualquer alteração na toxicidade do veneno total, sugerindo ser esta dose insuficiente para atenuar este veneno. Por outro lado, a dose de 1000 Gy levou a uma diminuição da toxicidade da ordem de 2,3 vezes, enquanto a dose letal 50% não foi alcançada para a amostra irradiada com 2000 Gy até a dose de 300 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (3,7 DL_{50}).

Veneno	DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{animal}$ de 20 g)	intervalo de confiança (nível de significância=95%)
Nativo	80,7	63,53 - 102,50
Irradiado com 500 Gy	77	59,41 - 100,74
Irradiado com 1000 Gy	184	144,90 - 236,01
Irradiado com 2000 Gy	>300	--

Tabela 1: dose letal 50% do veneno de *B. jararacussu* nativo e submetido às várias doses de radiação gama calculada pelo método de Spearman-Kärber. Cada grupo consistiu de 5 animais, machos, com peso de 20 ± 2 g. As amostras foram inoculadas pela via intraperitoneal, em um volume de 200 μl . A concentração protéica inicial foi de 300 μg e o fator de diluição foi de 1,3.

Análise eletroforética:

Da mesma maneira que já foi observado com outros venenos irradiados, os perfis eletroforéticos (Fig.1) apontam para a formação de um arraste na faixa de maior peso molecular com concomitante desaparecimento de algumas bandas para as amostras irradiadas com as doses de 1000 e 2000 Gy, sugerindo a formação de agregados. Na amostra 4 (veneno total irradiado com a dose de 1000 Gy) observou-se perda de resolução das bandas de peso molecular acima de 66 kDa, assim como diminuição da intensidade da banda com peso molecular em torno de 20 kDa. Ao observar-se o perfil da amostra irradiada com 2000 Gy, notamos que as bandas de alto peso molecular não foram detectadas e que a banda na região dos 20 kDa torna se muito tênue, com a concomitante formação de um arraste. Nesta amostra ainda, pode-se observar o alargamento da banda com peso molecular em torno de 14 kDa, banda esta que encerra as miotoxinas. O veneno irradiado com 500 Gy mostrou um perfil semelhante ao do veneno nativo, sugerindo mais uma vez que esta dose é insuficiente para promover alterações significativas no veneno. As alterações de peso molecular observadas são condizentes com as observações de outros autores ^{2,17,37,39,40,41} que também observaram mudanças nos perfis eletroforéticos de venenos e toxinas irradiadas, atribuindo-as a alterações de estrutura terciária e quaternária e a formação de agregados decorrente da formação de pontes intercadeias entre moléculas protéicas.

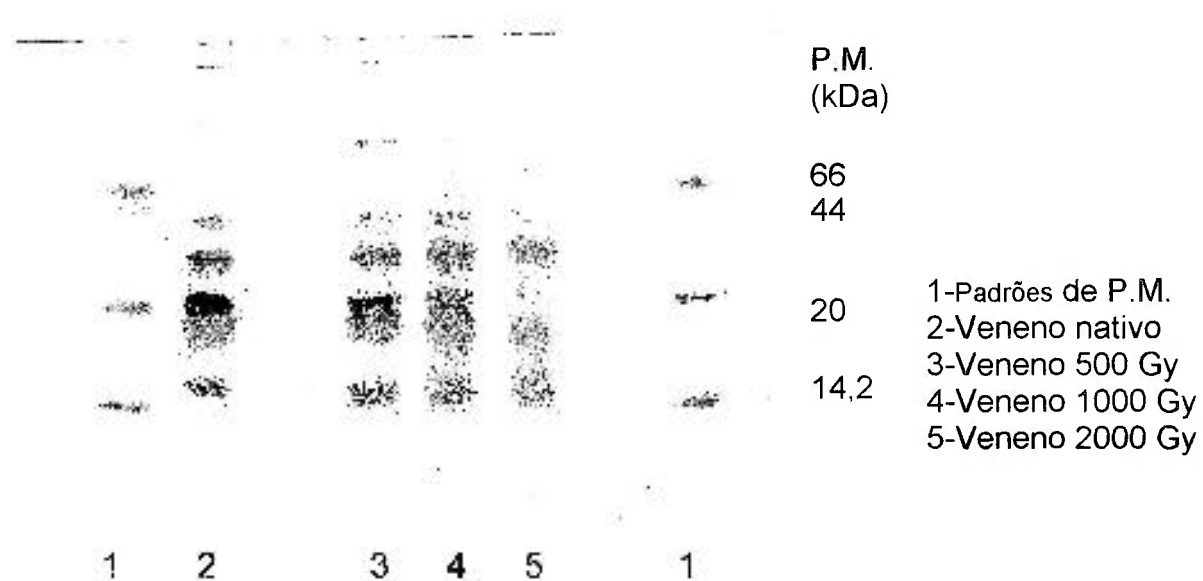


Figura 1: SDS-PAGE a 15% em sistema não reduzido do veneno de *B. jararacussu* nativo e submetido a várias doses de radiação gama. Foram aplicados 40 µg de amostra por poço e procedeu-se á separação fixando-se a corrente em 20 mA. A seguir o gel foi fixado e corado com Coomassie Blue 250-R.

Análise cromatográfica em HPLC:

Esta metodologia se mostrou adequada para analisar qualitativamente e quantitativamente as alterações sofridas pelas amostras submetidas à radiação gama. Optou-se por esta metodologia em detrimento da cromatografia convencional por podermos analisar as amostras utilizando quantidades bem menores de veneno, pela maior resolução e pela velocidade de análise que o sistema proporciona.

A análise cromatográfica do veneno nativo resultou em 10 picos (fig. 2 A). Todas as amostras irradiadas cujos perfis são apresentados a seguir foram comparadas a este perfil no que se refere a área, altura e tempos de retenção.

pico	área (%)	tempo de retenção (min)
01	27.179	11.41
02	20.463	12.77
03	07.699	14.69
04	04.871	15.97
05	05.074	17.17
06	01.715	18.26
07	18.471	20.24
08	02.719	22.20
09	04.730	24.32
10	07.105	28.06

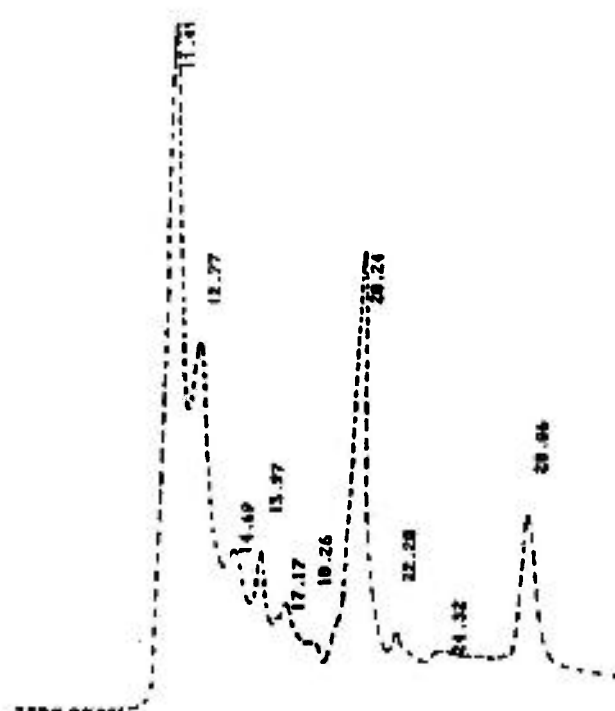


Figura 2A: Perfil cromatográfico do veneno nativo em HPLC. Foram aplicados 20 μ l de veneno, correspondendo a 40 μ g de proteína, por injeção. A coluna utilizada foi uma coluna de exclusão molecular TSK G-2000 SW de 600x7,5 mm, sendo a fase móvel NH_4HCO_3 , 25 mM pH 7,5. O fluxo foi de 1ml/minuto e a absorvância determinada a 220 nm.

O veneno irradiado com 500 Gy (fig. 2 B) apresentou um perfil bastante similar ao do veneno nativo, todavia, observou-se um ligeiro deslocamento de linha base entre 11 e 20 minutos, associado a perda de resolução neste intervalo. Este fato pode ser atribuído à formação de complexos protéicos de peso molecular variado, resultantes de agregação e associação. Outra variação detectada nesta amostra foi o aumento do pico que precede a fração que elui em 20 minutos, associado a um decréscimo da ordem de 5% da área do pico desta. Cabe ressaltar que este pico encerra as fosfolipases e a miotoxina conforme determinamos por calibração prévia com padrões de peso molecular. Apesar destas alterações estruturais, a toxicidade do veneno irradiado nesta dose não se alterou, sugerindo que as modificações sofridas pelo veneno irradiado com 500 Gy são insuficientes para acarretar atenuação de sua toxicidade. É interessante notar que o método cromatográfico permitiu detectar alterações estruturais nesta amostra, enquanto a eletroforese não foi sensível o suficiente, nas condições utilizadas, para evidenciar tais modificações.

pico	área (%)	tempo de retenção (min)
01	24.877	11.48
02	24.217	12.84
03	08.103	14.50
04	05.936	16.06
05	02.367	16.97
06	04.574	17.21
07	02.748	18.76
08	15.251	20.20
09	03.653	21.93
10	04.252	23.94
11	04.022	27.08

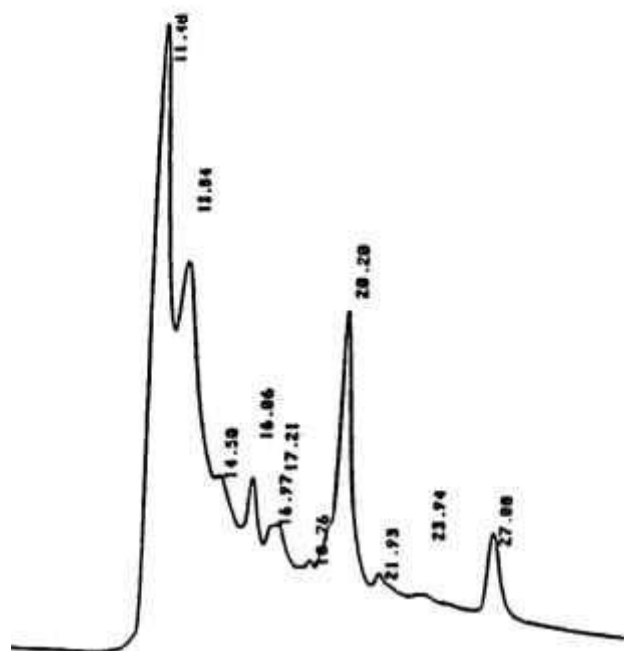


Figura 2B: Perfil cromatográfico do veneno irradiado com 500 Gy. Foram aplicados 20 μ l de veneno, correspondendo a 40 μ g de proteína, por injeção. A coluna utilizada foi uma coluna de exclusão molecular TSK G-2000 SW de 600x7,5 mm, sendo a fase móvel NH_4HCO_3 , 25 mM pH 7,5. O fluxo foi de 1ml/minuto e a absorvância determinada a 220 nm.

A análise do perfil de eluição da amostra irradiada com 1000 Gy (fig.2 C) apontou para uma diminuição da altura do pico cujo tempo de retenção era de 11,41 minutos na amostra nativa. A área do mesmo não diminuiu proporcionalmente em decorrência do ligeiro alargamento que este pico sofreu. Notou-se também uma perda de resolução entre este pico e o subsequente, sugerindo mais uma vez a ocorrência de moléculas de peso molecular intermediário que passam a eluir neste intervalo. Este fato justificaria o aparecimento do arraste observado na análise eletroforética das amostras irradiadas nas doses de 1000 e 2000 Gy. Além disto, observou-se o aparecimento de arraste após o pico dos 12,7 minutos, ocultando a fração que eluía com 14,69 minutos na amostra nativa, assim como um deslocamento da linha base para cima, da mesma maneira que já se havia observado no perfil anterior. Ocorreu também alteração do pico cujo tempo de retenção na amostra nativa é de 17,17 minutos. Uma diminuição considerável da altura do pico que encerra as fosfolipases e a miotoxina pode ser observada, com concomitante aparecimento de um "fronting peak", sugerindo modificações estruturais dos componentes desta fração. A presença do primeiro pico, com tempo de retenção de 9,6 minutos, pode ser atribuída a retenção na pré-coluna de agregados de alto peso molecular, uma vez que as proteínas eluídas no pico dos 11,4 minutos já se encontravam acima do limite superior de exclusão (V_0) da coluna e, conseqüentemente, eliminando a possibilidade de separação de novas frações de alto peso molecular.

pico	área (%)	tempo de retenção (min)
01	02.548	09.60
02	26.203	11.38
03	39.840	12.73
04	06.556	15.98
05	07.889	16.85
06	02.277	18.70
07	11.886	20.10
08	01.214	21.85
09	00.122	22.88
10	00.040	23.14
11	01.425	27.00

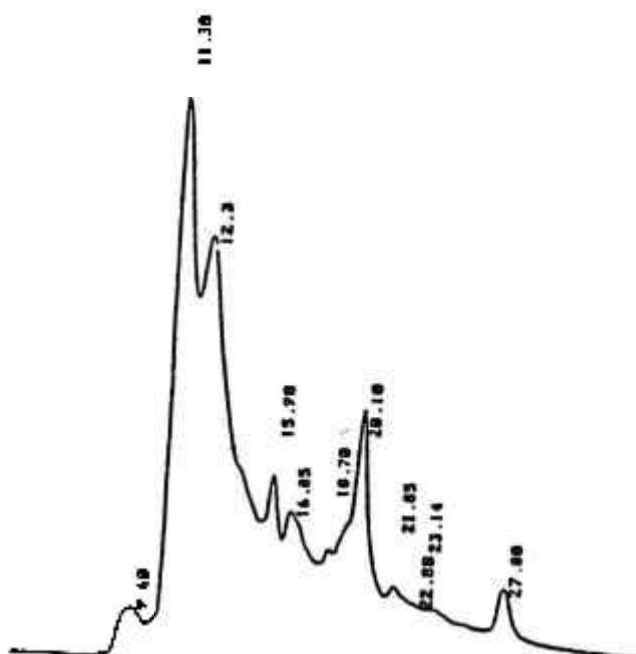


Figura 2C: Perfil cromatográfico do veneno irradiado com 1000 Gy. Foram aplicados 20 μ l de veneno, correspondendo a 40 μ g de proteína, por injeção. A coluna utilizada foi uma coluna de exclusão molecular TSK G-2000 SW de 600x7,5 mm, sendo a fase móvel NH_4HCO_3 25 mM pH 7,5. O fluxo foi de 1ml/minuto e a absorvância determinada a 220 nm.

O perfil da amostra irradiada com 2000 Gy (fig. 2 D) corroborou todas as observações anteriores mostrando que todas as modificações em relação à amostra nativa decorreram de um processo dose-dependente. O pico cujo tempo de retenção era de 9,7 minutos voltou a ser observado, aquele que eluía em torno dos 11 minutos sofreu diminuição de altura e alargamento com consequente perda de resolução do pico subsequente que apresentou um aumento de área relativa da ordem de 14%. O pico das fosfolipases apresentou uma considerável diminuição, passando de 18% de área relativa no veneno nativo para 8% na amostra irradiada com 2000 Gy. A formação de agregados de alto peso molecular é condizente com os achados de Guarnieri-Cruz¹⁷ que observou o mesmo irradiando veneno de *B. jararaca*.

pico	área (%)	tempo de retenção (min)
01	00.811	09.73
02	22.921	11.33
03	33.901	12.62
04	06.279	15.93
05	08.891	16.80
06	02.248	18.84
07	03.917	19.20
08	08.458	20.02
09	04.685	21.82
10	02.957	23.84
11	01.380	27.06

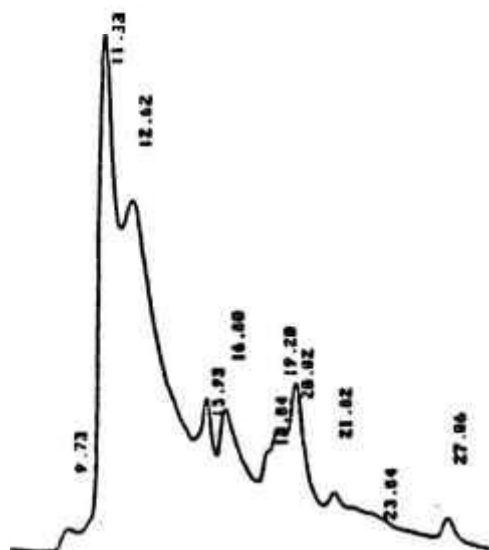


Figura 2D: Perfil cromatográfico do veneno irradiado com 2000 Gy. Foram aplicados 20 μ l de veneno, correspondendo a 40 μ g de proteína, por injeção. A coluna utilizada foi uma coluna de exclusão molecular TSK G-2000 SW de 600x7,5 mm, sendo a fase móvel NH_4HCO_3 25 mM pH 7,5. O fluxo foi de 1ml/minuto e a absorvância determinada a 220 nm.

Atividade fosfolipásica :

Esta atividade, conforme se observa no gráfico abaixo (fig. 3) decresceu segundo um padrão dose-dependente com doses de radiação superiores a 500 Gy . A atividade enzimática do veneno irradiado com 1000 Gy sofreu ligeira diminuição (<10%) enquanto o veneno irradiado com 2000 Gy ainda apresentava cerca de 65% da atividade do veneno nativo. Estas observações sugerem que as fosfolipases do veneno de *B. jararacussu* foram extremamente radioresistentes, do mesmo modo que já foi observado por Nascimento ⁴⁰, com a fosfolipase de *C. d. terrificus*.

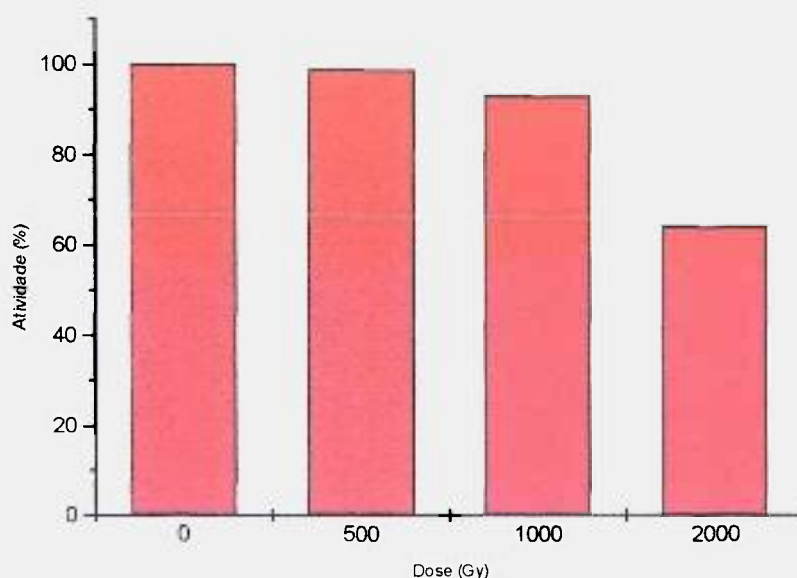


Figura 3: Atividade fosfolipásica do veneno de *B. jararacussu* nativo e submetido a várias doses de radiação gama. Foram aplicados 10 µl de amostra a 30 µg/ml por poço (Ø=2 mm), em duplicata. Após 24 horas de incubação a 37°C em câmara úmida procedeu-se à medida do halo de hémolise.

Atividade caseinolítica:

Do mesmo modo que ocorreu com a atividade fosfolipásica, observou-se (figura 4) uma relação de dose efeito na atenuação da atividade caseinolítica do veneno de *B. jararacussu*. Todavia a atenuação desta atividade foi maior, sugerindo serem as enzimas responsáveis por esta atividade mais radiosensíveis do que as fosfolipases. Os dados obtidos por Guarnieri-Cruz ¹⁷ com veneno de *B. jararaca* irradiado nas mesmas doses foram muito próximos daqueles obtidos no presente trabalho, sugerindo serem as enzimas proteolíticas destes dois venenos bastante semelhantes no que se refere a radiosensibilidade. O fato da atenuação desta atividade ocorrer de modo bifásico, com uma primeira diminuição de atividade da ordem de 35% com a dose de 500 Gy, enquanto as doses maiores só levaram a perda de atividade adicional de cerca de 10% sugere tratar-se de um sistema envolvendo pelo menos 2 enzimas. A primeira, radiosensível, cuja atividade foi abolida com a menor dose de radiação aplicada. A atividade caseinolítica remanescente seria então consequência da ação de outra(s) enzima(s) dotada(s) de maior radiorresistência, cuja atividade só é parcialmente afetada pelas doses de 1000 e 2000 Gy. As atividades enzimáticas testadas foram progressivamente atenuadas em função da dose de radiação, sendo as fosfolipases mais radioresistentes que as enzimas proteolíticas. Contudo, uma correlação entre diminuição das atividades enzimáticas e toxicidade dificilmente poderia ser estabelecida já que a toxicidade do veneno total decorre de um sinergismo entre os diversos componentes do mesmo.

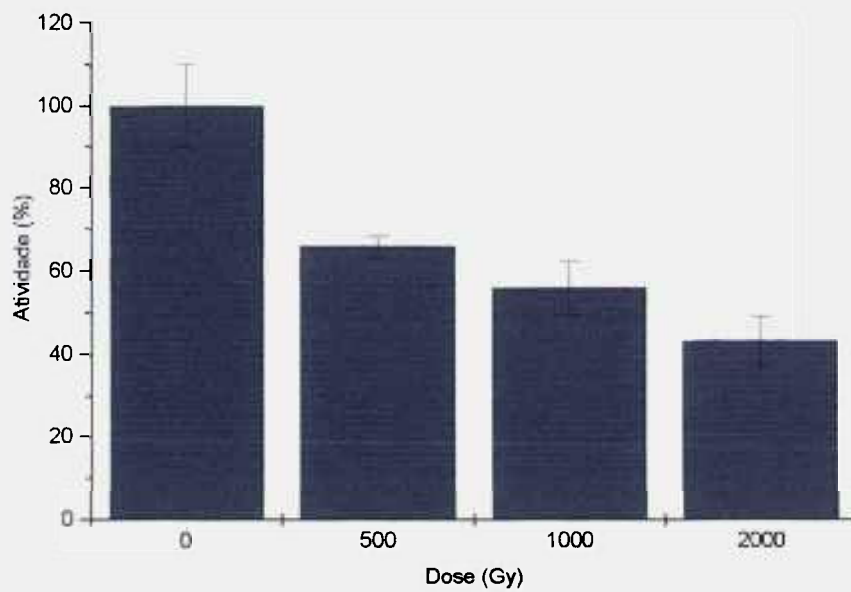


Figura 4: atividade caseinolítica do veneno de *B. jararacussu* nativo e submetido a várias doses de radiação gama. A concentração de veneno das amostras foi de 200 $\mu\text{g/ml}$ em PBS. Estas foram incubadas, em quadruplicata, com 1ml de caseína 1% em PBS, a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 4ml de TCA 5%. Após centrifugação determinou-se a densidade óptica do sobrenadante a 280 nm.

Imunização dos animais e titulação dos anticorpos:

O protocolo de imunização utilizado resultou em anticorpos capazes de reconhecer o veneno nativo, mesmo quando se utilizou o veneno irradiado como imunógeno (fig 5) . Observou-se que o título de anticorpos foi o mesmo para ambos os antígenos testados até a diluição de 1:3200, enquanto nas diluições referentes à porção linear da curva de titulação os anticorpos antiveneno irradiado apresentaram um título discretamente superior. Este fato poderia estar associado à formação de nódulos nos pontos de inoculação do antígeno, observados no animal inoculado com veneno irradiado, fato que não ocorreu no animal imunizado com veneno nativo. Tais nódulos sugerem intensa reação inflamatória local, decorrente de ativação celular. Este processo acarretaria o acúmulo de células apresentadoras de antígeno no sítio inflamatório, podendo levar a uma resposta humoral mais eficiente.

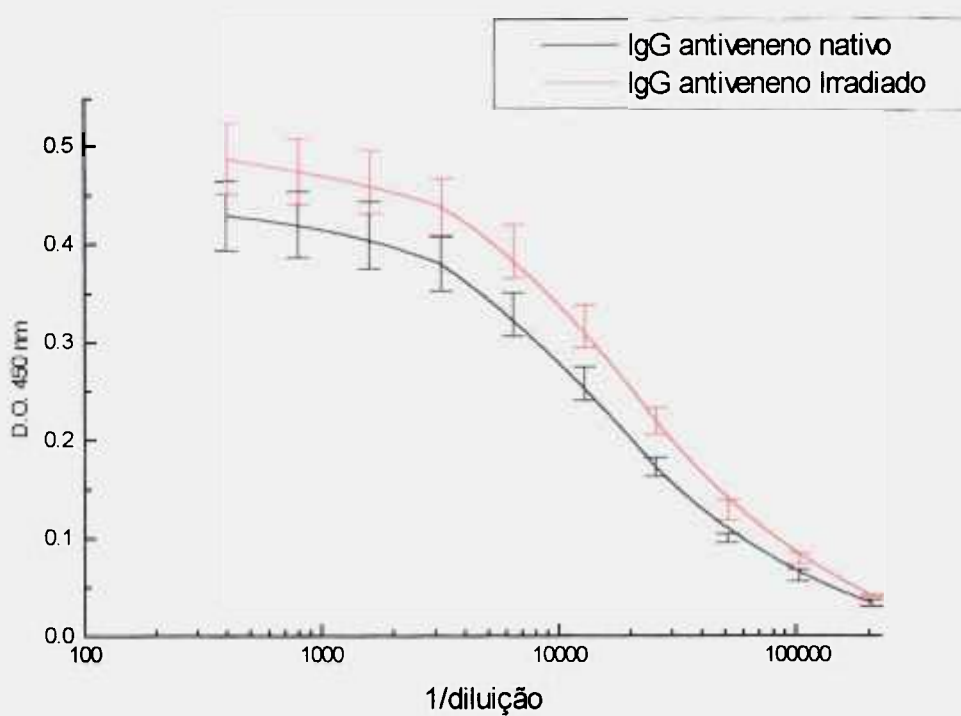


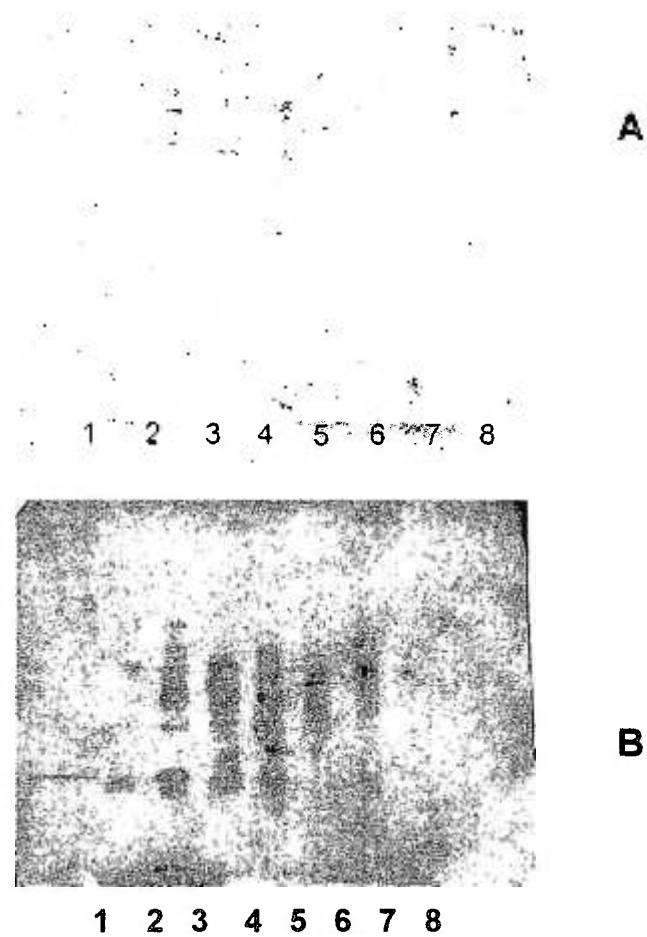
Figura 5: Titulação por ensaio imunoenzimático das IgG séricas antiveneno total de *B. jararacussu*. A placa foi sensibilizada com veneno total nativo (10 μ g/ml) em tampão carbonato pH 9,6. Como segundo anticorpo, utilizou-se IgG anti IgG conjugada a peroxidase 1:4000. Todas as diluições foram feitas em quadruplicata.

Western blot:

Esta metodologia mostrou existir uma diferença qualitativa entre as imunoglobulinas induzidas por veneno nativo ou irradiado com 2000 Gy. Como se pode observar (fig.6) os anticorpos resultantes da imunização com veneno irradiado parecem reconhecer bandas do veneno nativo, incluindo aquela que encerra as miotoxinas, que não são reconhecidas pelas imunoglobulinas do coelho imunizado com veneno nativo. Este dado sugere que a irradiação, de alguma forma, alterou a imunogenicidade de alguns componentes do veneno. Isto pode ser devido a maior imunogenicidade dos componentes de alto peso molecular formados durante a irradiação, conforme postulado por Baride e col.². Nascimento⁴⁰ e Nascimento e col.⁴¹, trabalhando com agregados isolados de crotoxina irradiada mostraram serem estes excelentes imunógenos, além de serem desprovidos de toxicidade, corroborando esta hipótese. Mais recentemente, Cardi⁵ mostrou serem as proteínas irradiadas mais eficientemente fagocitadas por células apresentadoras de antígeno, o que poderia levar a uma resposta humoral mais eficiente. Por outro lado, Maillére e Col.³² sugeriram ser a redução das pontes dissulfeto intracadeias uma etapa primordial do processamento do antígeno a ser apresentado para linfócitos T. Os radicais livres, basicamente o radical hidroxil, são capazes de reduzir pontes dissulfeto, podendo este mecanismo contribuir para uma maior imunogenicidade do veneno irradiado. Kume e Matsuda²⁷, investigando alterações estruturais e antigênicas sofridas por proteínas irradiadas, observaram alterações drásticas da estrutura secundária após a irradiação, assim como na hidrofobicidade das mesmas.

Como resultado das alterações de estrutura secundária, assim como da terciária, os epitopos conformacionais de proteínas irradiadas seriam destruídos podendo se atribuir a imunogenicidade de antígenos irradiados a epitopos lineares. Tais epitopos poderiam levar à formação de anticorpos com idiotipos cuja síntese o antígeno nativo não estimularia por não estarem expostos os determinantes antigênicos.

Cabe ainda ressaltar que o soro antiveneno irradiado se mostrou mais reativo quando ensaiado contra venenos botrópicos heterólogos. Conforme se pode notar, o soro antiveneno nativo reconheceu, além do veneno autólogo, apenas algumas bandas dos venenos de *B. moojeni* e de *B. neuwiedi*. O soro antiveneno irradiado mostrou-se mais reativo contra estes venenos, além de reconhecer bandas de todos os outros venenos botrópicos ensaiados. É ainda digno de nota o fato de ambos os soros produzidos serem gênero-específicos, não reagindo contra os venenos crotálico e elapídico testados.



1-*B. jararaca* 2-*B. jararacussu* 3-*B. moojeni* 4-*B. neuwiedi* 5-*B. cotiara* 6-*B. alternatus* 7-*C. d. terrificus* 8-*M. frontalis*

Figura 6: Western blot do veneno autólogo e de diversos venenos heterólogos frente a anticorpos antiveneno total nativo (A) ou irradiado (B)

Neutralização da atividade miotóxica

Os dados de creatina-quinase sérica (figura 7) sugerem que o soro produzido contra veneno nativo é ineficiente na neutralização das miotoxinas do veneno. Por outro lado, o soro antiveneno irradiado levou a uma menor liberação da enzima, sugerindo proteção contra a fração miolítica do veneno de *B. jararacussu*. Este fato reforça as observações anteriores no que se refere ao aumento de imunogenicidade de alguns componentes, parecendo ser o veneno irradiado mais eficiente na indução de anticorpos neutralizantes da atividade miotóxica. Este fato está de acordo com a observação de que o soro antiveneno irradiado reconhece a banda onde se encontram as miotoxinas. O fato do soro antiveneno irradiado neutralizar a miotoxidade do veneno de *B. jararacussu* sugere ainda que o veneno irradiado promoveu a síntese de anticorpos que, além de reconhecer a fração miotóxica, neutralizam a ação da mesma.

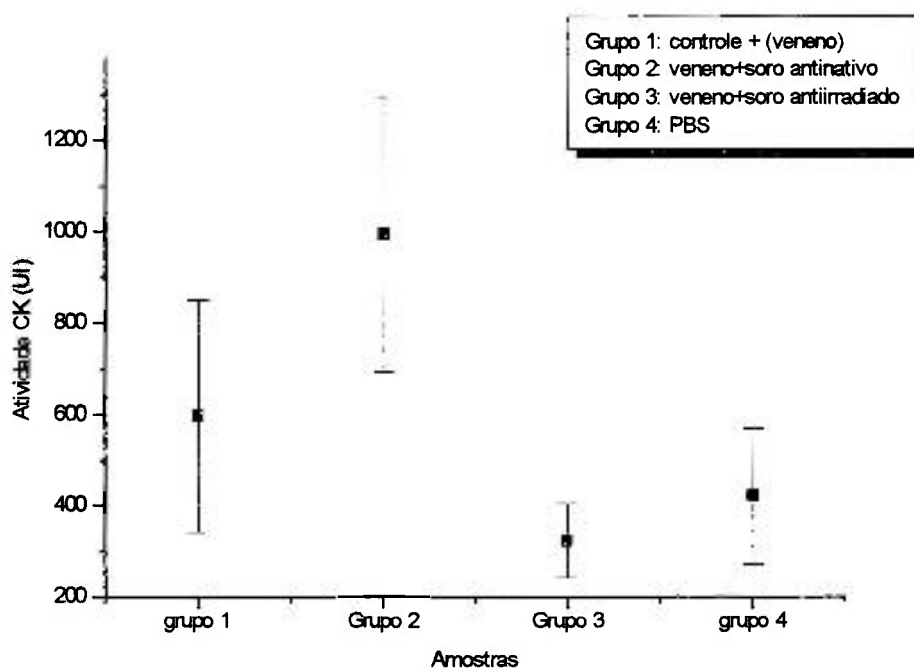


Figura 7: neutralização da liberação de creatina-quinase sérica. Cada ponto corresponde à média dos níveis de creatina-quinase de 10 animais. A leitura foi feita a 25°C e 340 nm por 5 minutos após incubação prévia de 3 minutos.

Conclusões

1-A radiação gama de cobalto 60 altera bioquimicamente o veneno de *Bothrops jararacussu* :

a) gerando produtos de peso molecular elevado,

b) atenuando sua toxicidade com doses acima de 500 Gy, sendo o fator de atenuação de 2,3x para o veneno irradiado com 1000 Gy e superior a 3,7x para aquele irradiado com 2000 Gy

c) atenuando algumas atividades enzimáticas de seus componentes.

2-O veneno irradiado mantém sua imunogenicidade bem como induz anticorpos com título discretamente superior aos induzidos pelo veneno nativo.

3-A especificidade dos anticorpos induzidos pelo veneno nativo difere daquela dos anticorpos induzidos pelo veneno irradiado reconhecendo estes componentes que as IgGs antiveneno nativo não reconheceram.

4- O soro obtido a partir de veneno nativo não neutraliza a atividade miotóxica, enquanto o veneno irradiado induz anticorpos protetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) AMARAL,C.F.S.; DOURADO,H.V.; KOUYOUMDJIAN,J.A.; CARDOSO,J.R.; CAMPOS,J.A.; AZEVEDO-MARQUES,M. & LOPES,P.F.A.-**Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1987. 53p.
- 2) BARIDE,R.N.; JAIN,S.D. & GAITONDE,B.B.-Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J. Med. Res.*,72:571-576,1980.
- 3) BJARNASON,J.B. & FOX,J.W.-Hemorrhagic toxins from snake venoms.*J.Toxicol.-Toxin review* 7(2): 121-209 1988
- 4) BUTLER,J.; LAND,E.J & SWALLOW,A.J.-Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.*,24:273-82,1984.
- 5) 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) .
- 6) CHIPPAUX,J.P.; WILLIAM,V. & WHITE,J. Snake venom variability:methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29:1279-1303,1991
- 7) CINTRA,A.C.O.; MARANGONI,S.; OLIVEIRA,B. & GIGLIO,J.R.- Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.*,12 (1),1993.

- 8) COSTA,L.M.; TAKEDA,A.K.; BARBOSA,S.F.C.; BERRA,J.A.P.; ADELINA,M.G.F.; SOERENSEN,B.; PINTO, J.R. & VANCETTO,M.D.C.- Estudo comparativo da resposta imune em cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, in natura, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. ***Vacinas e soros***, 1:24-29,1985.
- 9) COSTA,T.A.-Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)
- 10) DENSON,K.W.E; RUSSEL,F.E.; ALMAGRO,D.& BISHOP,R.C. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. ***Toxicon***,10:557-562,1972
- 11) DENSON,K.W.E.-Coagulant and anticoagulant action of snake venoms. ***Toxicon***,7:5-11,1969
- 12) DEVI,A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms In: ***Venomous Animals and Their Venoms***, Eds. Bucherl, W.; Buckley, E & Deulofen, V., Academic Press,New York, 1968.
- 13) DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI,H..G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, L.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J.- Cross reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. ***Mem. Inst. Butantan*** ,51:153-168, 1989.

- 14) DOS-SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R. de C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTTIERREZ, J.M. & FURTADO, M. F. D.- A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 34(2):77-83, 1992.
- 15) FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B & KAISER, I.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a Lysine-49 phospholipase A2 **Arch. Biochem. Biophys.**, 284:352-359, 1991
- 16) FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, 29:219-226, 1991
- 17) GUARNIERI-CRUZ, 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)
- 18) GUTIERREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E. & CERDAS, L.-An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, 26:411-413, 1988.
- 19) GUTIERREZ, J.M. & LOMONTE, B.-Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, 51:211-223, 1989.
- 20) GUTIERREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G. & CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, 23:887-892, 1985

- 21) HENEINE, I.F.; HENEINE, L.G.D.; DANIEL, J.P.; NASCIMENTO, M.C.S. & ROCHA, O.A.-Properties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination. *Anais da Acad. Ciencias Est. S. Paulo*, 57:55-66, 1988.
- 22) HOMSI-BRANDENBURGO, M.L.; QUEIROZ, L.S.; SANTOS-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, C.L. & GIGLIO, J.R.-Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom :partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, 26:473-479, 1988.
- 23) IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms In: LEE, C.Y., ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. V.52:61-158
- 24) KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.; HUTTON, R.A.; RUGMAN, F.P.; WARREL, D.A. & HAY, C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*, 29:961-972, 1991
- 25) KAMIGUTI, A.S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I.S. & NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 19:199-204, 1986
- 26) KOCHOLATY, W., F.; GOETZ, C.S.; ASHLEY, B.D.; BILLINGS, T.A. & LEDFORD, E.B.-Imunogenic response of the venoms of Fer-de-Lance, *Bothrops atrox asper*, la Cascabela, *Crotalus durissus durissus*, following photooxidative detoxification. *Toxicon*, 5:153-158, 1968.

- 27) KUME, T. & MATSUDA, T.-Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.* , 46:225-231, 1995.
- 28) KUNITZ, M. -Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-310, 1947.
- LAEMMLI, U.K. -Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970
- 29) LOMONTE, B. & GUTTIERREZ, J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revta. Biol. trop.* 31:37-40, 1993
- 30) LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.- Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 31) MAILLÈRE, B.; MOURIER, G., HERVÉ, M.; COTTON, J.; LEROY, S. & MÉNEZ, A.-Immunogenicity of a disulfide-containing neurotoxin: presentation to T-cells requires a reduction step. *Toxicon*, 33 475-482, 1995
- 32) MEBS, D.; EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y.- Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine-kinase. *Toxicon*, 21: 393-404, 1983.
- 33) MILLER, G.L.-Protein determination for large number of samples. *Anal. Chem.*, 31:964, 1959.

- 34) MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F. & TANIZAKI, M.M.-Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*, 28:1293-1301, 1990.
- 35) MOURA DA SILVA, A.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; NISHIKAWA, A.K.; BRODSKIN, C.L.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; DIAS DA SILVA, W. & MOTA, I. -Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops* . *Toxicon* , 28:181-188, 1990.
- 36) MURATA, Y.- Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 37) NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. & BARROS, M.A.R.-Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis*, 2:314-328, 1979.
- 38) 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).
- 39) NASCIMENTO, N.-Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina. São Paulo, 1995. (Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 40) NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R. & KAISER, I.I.-Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon* (in press).

- 41) OHSAKA, A.-Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: **Snake Venoms**, p. 480, Ed. Lee, Y., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg & New York, 1979.
- 42) OKONOJI, T.; HATTORI, Z.; OGIZO, A. & MITSUI, S.-Detoxification by persimon tannin of snake venoms and bacterial toxins. **Toxicon**, 17:524-527, 1979.
- 43) OUYANG, C.; TENG, C.M. & HUANG, T.F.-Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Asia Pacific J. Pharm.**, 2:169-179, 1987.
- 44) OVADIA, M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palestinae*. **Toxicon**, 16:479-487, 1987
- 45) OWNBY, C.L.; ODELL, G.V.; WOODS, W.M.; COLBERG, T.R.-Ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myonecrosis and lethality of myotoxin a and homologous crude venom. **Toxicon**, 21, 35-45, 1983.
- 46) QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J.- Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venoms. **Toxicon** 22:227-233, 1984.
- 47) RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo**, 44:143-145, 1989.

- 48) ROSENFELD,G.; NAHAS,L. & KELEN,E.M.A.-Coagulant, proteolytic and hemolytic properties of some snake venoms. In: ***Venomous Animals and Their Venoms***, Eds. Bucherl, W.; Buckley, E & Deulofen, V., Academic Press,New York, 1968.
- 49) ROSENFELD,G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America In: ***Venomous Animals and Their Venoms***, Eds. Bucherl, W.; Buckley, E & Deulofen, V., Academic Press,New York, 1971 v.2,.
- 50) SANCHEZ,E.F.; MAGALHÃES,A. & DINIZ,C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of bushmaster snake *Lachesis muta muta* . ***Toxicon***,25:611-619,1987.
- 51) SELISTRE,H.S.; QUEIROZ,L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P. & GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. ***Toxicon***,28:261-273,1990.
- 52) SKALKKA, M. & ANTONI, F.-Effect of radiation on the biological properties of proteins. In: ***Radiation sensitivity of toxins and animal poisons***. 1-13, Ed Int. Atomic Energy Agency, 1970.
- 53) SOUZA FILHO,J.N.- Efeitos da radiação ionizante na crotoxina (toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*) :estudos ao nível molecular São paulo,1988 (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares)

- TOWBIN, H. & GORDON, J. -Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:4350-4354, 1979.
- 54) TU, A. T. - Hemorrhagic proteases from snake venom . In *Hemostasis and animal venoms*. PIRKLE, H.; MARKLAND Jr, F. S., eds. 7:425-443, 1985.
- 55) VIDAL, J. C. & STOPPANI, A. O. M. - Isolation and purification of two phospholipase A from *Bothrops* venoms. *Arch. Biochem. Biophys.* 145: 543-556, 1971.
- 56) WHO - Progress in *characterization of venoms and standardization of antivenoms* , WHO offset publication N° 58, Geneva, 1981.