



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

OTIMIZAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO CROTÁLICO IRRADIADO E ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES IMONOLÓGICAS

PATRICIA BIANCA CLISSA

**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
1997**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OTIMIZAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO
CROTÁLICO IRRADIADO E ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES
IMUNOLÓGICAS**

PATRICIA BIANCA CLISSA

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

1997



“A independência mental, a curiosidade intelectual, a perseverança no trabalho, a religião da pátria e o amor à glória: tais as qualidades indispensáveis ao cultivador da investigação”.

(Ramon & Cajal, 1978)

“A ciência avança através de respostas provisórias, conjeturais, em direção a uma série cada vez mais sutil de perguntas que penetram cada vez mais fundo na essência dos fenômenos naturais.”

(Louis Pasteur, 1968)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero, meu orientador, pela confiança, apoio e incentivo dispensados.

A Dra. Nanci do Nascimento, por tudo.

A Maria Aparecida Pires Camilo, cujo apoio na fase final deste trabalho e amizade foram inestimáveis.

A Malvina Boni Mitake pela sincera amizade e constante apoio.

Aos demais integrantes do Grupo de Venenos, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Coordenadoria de Bioengenharia, especialmente à Patricia Alves, pela amizade, companheirismo e colaboração sempre presentes.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta dissertação.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A minha família (e bela família), pelo auxílio, interesse e incentivo dispensados durante minha carreira de estudante.

OTIMIZAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO CROTÁLICO IRRADIADO E ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS

Patricia Bianca Clissa

RESUMO

Dados de literatura mostram que a dose de 2,0 kGy de radiação gama, proveniente de uma fonte de ^{60}Co , reduz a atividade tóxica do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* sem alterar sua capacidade de induzir a formação de anticorpos. Quando a crotoxina, principal toxina do veneno crotálico, foi irradiada com a mesma dose, também verificou-se a atenuação de sua toxicidade e manutenção da imunogenicidade, fato este atribuído aos agregados (compostos de alto peso molecular gerados durante a irradiação), os quais apresentaram-se praticamente atóxicos, porém capazes de induzir a formação de anticorpos eficientes no reconhecimento e neutralização da toxicidade do veneno homólogo. Com o objetivo de estabelecer uma dose de radiação gama para o veneno de *Crotalus durissus terrificus* capaz de gerar grandes quantidades de agregados atóxicos, porém imunogênicos, amostras de veneno foram irradiadas nas doses de 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy e submetidas ao fracionamento por exclusão molecular. Após serem isolados, os produtos gerados pela irradiação foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros: quantidade produzida, alterações moleculares, atividade tóxica, atividade imunogênica e capacidade neutralizante dos anticorpos gerados. Estes parâmetros foram avaliados também para o veneno irradiado sem sofrer nenhum processo de fracionamento, o veneno total irradiado. Os resultados obtidos foram comparados com o veneno não irradiado, confirmando ser a dose de 2,0 kGy a mais eficiente na associação da atenuação da toxicidade e manutenção da imunogenicidade do veneno crotálico, enquanto as demais doses, apesar de mostrarem-se eficientes na atenuação da toxicidade, foram ineficientes na manutenção da atividade imunogênica. Assim, o veneno total irradiado com 2,0 kGy mostra-se um eficiente substituto do veneno nativo no processo de imunização de animais, no sentido de aumentar a produção de soro anticrotálico.

TOXICITY ATTENUATION OPTIMIZATION OF CROTALIC VENOM BY GAMMA RADIATION AND STUDIES OF ITS IMMUNOGENIC PROPERTIES

Patricia Bianca Clissa

ABSTRACT

Literature data show that 2.0 kGy dose of gamma radiation, generated by ^{60}Co source, reduces the toxic activity of *Crotalus durissus terrificus* venom, without altering its immunogenic capacity. When crotoxin, main toxin from crotalic venom, was irradiated with the same dose, toxicity was also reduced and the immunogenicity was maintained. This fact was attributed to aggregates (compounds with high molecular weight generated during irradiation), that showed no toxicity but were able to induce the antibodies formation against native venom. *Crotalus durissus terrificus* venom was irradiated with 2.0, 3.0, 5.0 and 10.0 kGy doses and submitted to molecular exclusion chromatography, in order to find an efficient dose that produces large amounts of non toxic but still immunogenic aggregates. After being isolated, the products of irradiation were evaluated for the amount produced, molecular alteration, and toxic and immunogenic activities. These parameters were also analyzed for the whole venom irradiated. The results from different doses irradiated venom were compared with native one, and 2.0 kGy dose was confirmed to be the most efficient in the association of toxicity attenuation with maintenance of immunogenicity of the crotalic venom, while other doses, in spite of being efficient in the toxicity attenuation, they were not able to keep the immunogenicity property. So, the dose of 2.0 kGy could be used to immunize animals in order to improve anticrotalic sera production.

	páginas
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA DE ACIDENTES OFÍDICOS	1
1.2 VENENO CROTÁLICO E SUA COMPOSIÇÃO	2
1.3 SOROTERAPIA	6
1.4 RADIAÇÃO IONIZANTE	10
1.5 RADIAÇÃO GAMA COMO AGENTE ATENUANTE	12
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 MATERIAIS	
3.1.1 <i>Animais</i>	18
3.1.2 <i>Veneno</i>	18
3.1.3 <i>Reagentes</i>	19
3.1.4 <i>Fonte de irradiação</i>	19
3.2 MÉTODOS	
3.2.1 <i>Irradiação do veneno</i>	19
3.2.2 <i>Quantificação dos produtos da irradiação</i>	20
3.2.3 <i>Isolamento dos agregados e frações irradiadas não agregadas</i>	20
3.2.4 <i>Atividade tóxica</i>	21
3.2.5 <i>Atividade imunogênica do veneno total irradiado</i>	23
3.2.6 <i>Atividade imunogênica dos agregados e não agregados</i>	25
3.2.7 <i>Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados e antifração irradiada não agregada</i>	26

3.2.8	<i>Capacidade neutralizante “in vitro” dos anticorpos antiveneno total nativo e irradiado</i>	27
3.2.9	<i>Análise por eletroforese em SDS-PAGE</i>	27
4	RESULTADOS	29
4.1	<i>Irradiação do veneno</i>	29
4.2	<i>Quantificação dos produtos da irradiação</i>	29
4.3	<i>Isolamento dos agregados e frações irradiadas não agregadas</i>	30
4.4	<i>Atividade tóxica</i>	35
4.5	<i>Atividade imunogênica do veneno total irradiado</i>	40
4.6	<i>Atividade imunogênica dos agregados e não agregados</i>	43
4.7	<i>Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados e antifração irradiada não agregada</i>	45
4.8	<i>Capacidade neutralizante “in vitro” dos anticorpos antiveneno total nativo e irradiado</i>	46
4.9	<i>Análise por eletroforese em SDS-PAGE</i>	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas, peptídeos e em pequenas proporções carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. Os principais componentes tóxicos são proteínas e enzimas, as quais estão diretamente relacionadas com a alimentação e defesa da serpente, promovendo imobilização e morte da presa animal (MEIER, 1990).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DE ACIDENTES OFÍDICOS

Apesar da longa tradição do Brasil no campo de ofidismo (VITAL-BRAZIL, 1987), somente na década passada foi definida uma política abrangente que enfocasse as múltiplas questões relacionadas aos acidentes humanos provocados por animais peçonhentos (CARDOSO, 1993).

O sistema de produção de antivenenos no Brasil vinha passando por uma crise desde o início dos anos 80, que culminou em maio de 1986 com o óbito de uma criança, atribuído “à falta do soro”. Esta situação levou o Ministério da Saúde a implantar um Programa Nacional de Ofidismo na antiga Secretaria de Ações Básicas em Saúde. Tal programa é formado por Grupos de Trabalho (GTs) composto por técnicos de diversas instituições científicas brasileiras, responsáveis por áreas específicas (CARDOSO, 1993).

A instauração deste programa tornou obrigatória a notificação dos acidentes ofídicos ao Ministério da Saúde, possibilitando assim estabelecer parâmetros quanto à

ocorrência, mortalidade e evolução clínica dos acidentes, uma vez que estes possuem grande importância médica e epidemiológica no Brasil (RESENDE et al., 1989).

Existem cerca de 40 espécies de serpentes peçonhentas e/ou venenosas no território brasileiro, que estão divididas em quatro gêneros distintos: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (CARDOSO, 1993). De um modo geral, estas serpentes estão distribuídas por todo o país e são responsáveis anualmente por 15,5 acidentes por 100.000 habitantes (RESENDE et al., 1989).

Hoje se sabe que o número de acidentes ofídicos ocorridos nos últimos dez anos vem se mantendo constante, entretanto o número de óbitos vem diminuindo consideravelmente, de cerca de 200 óbitos por ano no início do programa para cerca de 80 atualmente (ARAÚJO, F.A.A. Comunicação pessoal, Ministério da Saúde).

Entre os quatro gêneros responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* causam o maior número de acidentes, 88,3%, seguido pelas do gênero *Crotalus*, 8,3%, *Lachesis*, 2,7% e *Micrurus*, 0,7% (RESENDE et al., 1989). No entanto, a gravidade dos acidentes é maior nos acidentes crotálicos, vindo em segundo lugar o gênero *Lachesis* e a seguir os gêneros *Micrurus* e *Bothrops*, cujos coeficientes de letalidade são 3,3%, 1,4%, 0,7% e 0,5% respectivamente (RESENDE et al., 1989). Sendo assim, as serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus* se destacam das demais por causarem os acidentes com maior índice de letalidade, representando o envenenamento ofídico mais grave em nosso meio.

1.2 VENENO CROTÁLICO E SUA COMPOSIÇÃO

As espécies do gênero *Crotalus* existentes no Brasil habitam principalmente as regiões semi-áridas e estão divididas em seis subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavela*, *Crotalus*

durissus marajoensis, *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus trigonicus* (BARRAVIERA, 1993).

A subespécie mais estudada e mais freqüente é a *Crotalus durissus terrificus*. O veneno desta serpente é rico em enzimas e peptídeos biologicamente ativos, tendo sido caracterizadas as seguintes frações enzimáticas: 5-nucleotidases, L-aminoxidases, enzima tipo trombina, fosfodiesterases, atividades de caliceína tipo tissular e NAD-hidrolase. Entre as principais toxinas encontram-se: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (BERCOVICI et al., 1987).

A convulxina é uma glicoproteína, com peso molecular variando entre 60.000 e 72.000 Da, encontrada também no veneno de *Crotalus durissus cascavela*. (STOCKER, 1990b). A convulxina, cuja dose letal 50% em camundongos (DL_{50}) é de 524 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pela via intravenosa (KARLSSON, 1979), é menos tóxica do que o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, cuja DL_{50} é de 267 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (KOCHOLATY et al., 1971). Quando esta toxina purificada foi injetada em animais, os sintomas observados foram todos em função da concentração. Pequenas quantidades desta toxina (5 $\mu\text{g}/\text{animal}$), injetadas pela via intravenosa em camundongos, mostraram uma ação dentro de 20 segundos, causando taquipnéia seguida por apnéia de curta duração. Maiores concentrações (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$) ocasionaram uma intensa crise convulsiva que finalizou em morte do animal (PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981). A convulxina ainda estimula a agregação e lise plaquetárias no sistema hemostático (STOCKER, 1990a).

A giroxina apresenta peso molecular variando entre 33.000 e 35.000 Da. Esta toxina provoca uma síndrome convulsiva bastante peculiar em camundongos, caracterizada por movimentos circulatorios do corpo ao longo do eixo longitudinal, retornando ao seu estado normal após 2 horas, dependendo da quantidade inoculada. A giroxina ainda apresenta as características de uma proteína coagulante do

fibrinogênio no plasma de mamíferos, exercendo assim uma atividade tipo trombina (ALEXANDER et al., 1988).

A crotoxina é o principal componente neurotóxico encontrado no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, representando cerca de 60% do seu peso seco. A sua DL₅₀ pela via intravenosa em camundongos é de 82 µg/kg (VITAL BRAZIL et al., 1979), apresentando um pI de 4,7.

Esta toxina é formada por 2 subunidades, sendo uma básica, a fosfolipase A₂, com peso molecular de 14.000 Da (AIRD et al., 1986) e uma ácida, a crotapotina, com peso molecular de 9.000 Da (AIRD et al., 1990) que inibe a atividade enzimática e potencializa a letalidade da fosfolipase A₂ (MEBS, 1990).

A fosfolipase A₂ é uma enzima encontrada em muitos venenos ofídicos, que catalisa a clivagem de fosfolipídeos na posição 2, liberando uma molécula de ácido graxo insaturado e um fosfatídeo. Esta reação, direta ou indiretamente, causa danos às membranas biológicas. A fosfolipase A₂ possui características espécie-específicas e conforme estas características os danos serão dirigidos para tecidos-alvos. A ação desta enzima pode ser dirigida aos fosfolipídeos do sistema hemostático, inibindo a coagulação sanguínea; aos trombócitos, inibindo a agregação plaquetária; às células vermelhas do sangue, causando hemólise; às membranas das células musculares, causando mionecrose; às células musculares cardíacas, atuando como cardiotoxinas ou ainda às estruturas terminais dos neurônios, impedindo a liberação de neurotransmissores (STOCKER, 1990b).

A fosfolipase A₂ presente na crotoxina possui ação miotóxica e principalmente neurotóxica, agindo na junção neuromuscular inibindo a liberação de neurotransmissores (ação pré-sináptica) ou, em menor escala, bloqueando os receptores envolvidos na neurotransmissão (ação pós-sináptica) (STOCKER, 1990b). Entretanto, esta atividade está presente somente quando a fosfolipase A₂ se encontra

associada à crotapotina; com o complexo dissociado ocorre a perda da atividade neurotóxica pela enzima (MEBS, 1990).

A crotamina é uma toxina polipeptídica básica, apresentando pI de 10,3, com peso molecular de 4.900 Da (LAURE, 1975). É encontrada apenas na peçonha de cascavéis de certas regiões da América do Sul (Argentina, Bolívia, norte do Paraná e parte do Estado de São Paulo). GONÇALVES & POLSON (1947) verificou que quando injetada pela via intraperitoneal em camundongos, provoca contrações irregulares e espontâneas das patas posteriores, resultando em paralisia das mesmas. A crotamina age nas membranas das fibras musculares alterando sua permeabilidade ao sódio. Esta toxina possui atividade tóxica de 1.500 µg/kg, quando injetada pela via intravenosa em camundongos (VITAL BRAZIL, 1979).

São três as mais importantes atividades encontradas no veneno crotálico: *neurotóxica*, *miotóxica* e *coagulante*. O diagnóstico clínico do acidente crotálico baseia-se na observação de manifestações sistêmicas decorrentes destas atividades (JORGE & RIBEIRO, 1992).

No local da picada pode haver marcas das presas ou escoriações, edema discreto e raramente eritema. Geralmente não há dor e ocorre uma sensação parestésica no local, podendo persistir por semanas. São referidos também sintomas gerais como mal-estar, náuseas, sudorese, prostração, sonolência e, menos freqüentemente, agitação (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992).

As manifestações decorrentes da ação neurotóxica do veneno são evidenciadas clinicamente através da ptose palpebral uni ou bilateral e flacidez da musculatura da face, caracterizando um fácies miastênico ou fácies neurotóxico. Há oftalmoplegia, podendo ocorrer alterações do diâmetro pupilar (midríase), com referência de visão turva e diplopia. A regressão dos sintomas e sinais oculares pode ocorrer em 4 ou 5 dias.

A ação miotóxica do veneno é evidenciada por dores musculares generalizadas e por alteração da cor da urina, que pode tornar-se avermelhada e progressivamente marrom, devido à liberação de mioglobina. A urina pode readquirir a sua coloração habitual dentro de 1 ou 2 dias, caso não tenha ocorrido danos mais sérios ao aparelho renal.

A ação coagulante do veneno crotálico por sua vez, é observada em cerca de 40% dos pacientes por meio da incoagulabilidade sanguínea ou do aumento no tempo de coagulação, como consequência do consumo de fibrinogênio promovido pela enzima tipo trombina presente neste veneno (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992).

As complicações mais graves do acidente crotálico são a insuficiência renal aguda e mais raramente a insuficiência respiratória aguda. Estas costumam ocorrer naqueles pacientes tratados tardiamente ou que receberam o tratamento inadequado (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992).

1.3 SOROTERAPIA

O tratamento que vem sendo utilizado há quase 100 anos com bastante eficiência em acidentes ofídicos, entre eles o crotálico, é a soroterapia. Este consiste na administração intravenosa de soro antiofídico.

No Brasil, a produção de antivenenos ofídicos, escorpionícos e aracnídeos é realizada pelo Instituto Butantan (SP), Fundação Ezequiel Dias (MG) e Instituto Vital Brazil (RJ), sendo distribuído para todo o país pelo Ministério da Saúde. Nestas três Instituições a produção de soros antipeçonhentos específicos é feita com a inoculação dos venenos em cavalos, que, pela facilidade de resposta ao estímulo da peçonha e pelo seu grande porte, favorecem a produção de grandes volumes de sangue rico em anticorpos (FAN & FRANÇA, 1992).

A produção de soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno. Entende-se por imunogenicidade a capacidade de uma molécula induzir uma resposta imune, que é determinada tanto pela estrutura química intrínseca da molécula inoculada como pela capacidade do animal hospedeiro em reconhecer ou não o composto injetado (HARLOW & LANE, 1988). Alguns venenos, no entanto, podem apresentar frações imunossupressoras, como, por exemplo, as encontradas no veneno de *Lachesis muta* por STEPHANO et al. (1996), não sendo encontradas equivalentes tanto nos venenos de *Bothrops* quanto nos de *Crotalus*.

Para a imunização dos cavalos há a necessidade da mistura de adjuvantes aos venenos (SOERENSEN, 1990). Adjuvantes são substâncias não específicas que estimulam a resposta imune. O uso de adjuvantes possibilita a liberação lenta dos antígenos (por formar uma capa protetora envolvendo o antígeno, protegendo-o contra o rápido catabolismo), além de estimular uma resposta imune não específica pelo aumento na liberação de linfocinas; estas estimulam diretamente a atividade de células processadoras de antígeno e causam uma reação inflamatória no local da injeção (HARLOW & LANE, 1988). Os adjuvantes que vêm sendo utilizados com bons resultados são o adjuvante de Freund completo e o Incompleto, que são administrados respectivamente no primeiro e segundo inóculos e o alginato de sódio ou hidróxido de alumínio nos demais. Devido a algumas reações adversas causadas por estes adjuvantes nos animais soroprodutores, têm sido realizados esforços no sentido de identificar novos adjuvantes eficientes para a produção de antivenenos (RUCAVADO et al., 1996).

Os venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus* não são considerados bons imunógenos (SOERENSEN, 1990). SCHEAFFER et al.(1988) pesquisaram a capacidade imunogênica de venenos crotálicos avaliando a capacidade de ligação de frações deste veneno com um soro polivalente anticrotálico disponível comercialmente. O método utilizado foi o ensaio imunoenzimático de ligação

(ELISA). Os autores observaram um padrão de reconhecimento bastante singular quanto ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, com baixos títulos de ELISA, demonstrando sua fraca imunogenicidade e sugerindo que a neutralização das toxinas deste veneno pelo antiveneno pode ser fraca. Os autores sugerem que esta diferença no potencial imunogênico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* seja independente do peso molecular de seus componentes.

No esquema de imunização podem ser utilizadas frações atóxicas isoladas dos venenos, que mantenham a capacidade de induzir a formação de anticorpos contra as frações tóxicas, tal como foi observado por SANTOS et al. (1989). Os autores imunizaram cavalos e burros com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e com a fosfolipase A₂ isolada. Os dois antígenos foram capazes de tornar os cavalos (e somente estes), resistentes às doses letais do veneno crotálico, demonstrando assim que esta fosfolipase atóxica pode ser um substituto eficiente para o veneno nativo na produção de um anti-soro comercial.

A alta toxicidade do veneno de cascavel impede a inoculação de doses capazes de fornecer uma resposta imunológica adequada nos animais soro-produtores, tendo como consequência um soro com baixos níveis de anticorpos. Por essas razões torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que reduzam a toxicidade e aumentem a resposta imunológica dos animais, aumentando assim a quantidade de anticorpos presentes no soro.

Os venenos podem perder a sua atividade tóxica, conservando entretanto as suas características antigênicas e imunogênicas, com capacidade de, quando introduzido num organismo, induzir a formação de anticorpos. Com a perda da fração tóxica este produto recebe o nome de anaveneno (SOERENSEN, 1990) ou toxóide (BOQUET, 1979).

Quanto às técnicas utilizadas para preparação de anavenenos, encontram-se inúmeros trabalhos em que foram utilizados agentes químicos e/ou físicos para tal propósito. Dentre os agentes químicos destacam-se: carboximetil-celulose (MOROZ et al., 1963); fotoxidação na presença de azul de metileno (KOCHOLATY et al., 1968); β -mercaptoetanol (YANG, 1970); agentes quelantes (GIROUX & LACHMANN, 1981); formalina (COSTA et al., 1985); iodo (DANIEL et al., 1987); glutaraldeído (GUIDOLIN et al., 1989); entre outros. Entre os agentes físicos, os principais são: radiação X (FLOWERS, 1963); radiação ultravioleta (TEJASEN & OTTOLENGHI, 1970); calor (COSTA et al., 1985) e radiação gama (ROGERO & NASCIMENTO, 1995).

Em alguns destes estudos as toxinas obtidas ainda mantiveram certa toxicidade e apresentaram baixa imunogenicidade. Como exemplos podemos citar o estudo de COSTA et al. (1985), no qual foi comparada a ação imunogênica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* destoxicado pelo tratamento com formaldeído e pela ação térmica, com o veneno nativo. Neste estudo os autores verificaram que o veneno submetido ao tratamento por calor ainda se apresentava tóxico e com baixa imunogenicidade quando comparado ao veneno submetido ao tratamento por formaldeído; e que, embora este último tenha apresentado bons resultados, ao final do esquema de imunização ele não foi tão eficiente quanto o veneno nativo. Entretanto, algumas metodologias mostraram-se bem sucedidas; como exemplos podemos citar os trabalhos de DANIEL et al. (1986) e ROGERO & NASCIMENTO (1995). Os primeiros obtiveram um toxóide com o tratamento do veneno crotálico pela iodação que se apresentou cerca de 100 vezes menos tóxico que o veneno não tratado e ainda imunogênico. A radiação gama, utilizada pelos últimos autores, também vem se mostrando bastante eficiente na atenuação de venenos ofídicos, sendo capaz de diminuir a toxicidade, sem alterar a imunogenicidade dos venenos. Esta metodologia apresenta ainda a vantagem de não acrescentar nenhuma substância química ao veneno.

1.4 RADIAÇÃO IONIZANTE

Os raios cósmicos, a radiação gama, os raios X, a radiação ultravioleta, as microondas e as ondas de rádio fazem parte das radiações eletromagnéticas (FREIRE-MAIA, 1972). Uma das características das radiações eletromagnéticas é a alta energia associada à ausência de massa, o grande poder de penetração e a capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propagam.

Dentro do espectro eletromagnético as microondas e as ondas de rádio são classificadas como não ionizantes. As radiações ultravioleta encontram-se em um nível intermediário, entre as radiações ionizantes e não ionizantes, e os raios cósmicos, a radiação gama e os raios X são classificados como radiações ionizantes (FREIRE-MAIA, 1972).

As radiações ionizantes recebem este nome porque provocam ionizações, ou seja, ao atravessarem uma substância (tecido biológico ou qualquer outro tipo de matéria) têm a propriedade de arrancar elétrons, em geral da camada periférica dos átomos, resultando na formação de pares de íons, positivo e negativo. Estes tipos de radiações eletromagnéticas causam também excitações, processos nos quais os elétrons das camadas externas do átomo-alvo absorvem energia suficiente para atingir um estado energético mais elevado, permanecendo associados ao átomo e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (GROSCH & HOPYWOOD, 1979).

A radiação inicialmente absorvida através dos processos de ionização e excitação é transferida para outros átomos e moléculas, produzindo várias espécies reativas, principalmente radicais livres. Um radical livre é um átomo ou molécula neutra, com um único elétron do orbital exterior desemparelhado, o qual é altamente reativo, quer doando seu elétron desemparelhado, quer combinando-o pela captura de um elétron de outro átomo (GROSCH & HOPYWOOD, 1979). Em se tratando de um material biológico, a produção destas espécies reativas tem profundas repercussões de

ordem química, que, por sua vez, acarretam alterações nas características destes materiais.

As proteínas são um dos principais constituintes de materiais biológicos, entre os quais se incluem os venenos de origem animal. A irradiação de proteínas no estado seco ou em solução leva a alterações químicas, físico-químicas e estruturais bastante significativas. Estas mudanças resultam em uma diminuição e inativação de algumas atividades biológicas destas proteínas, tais como atividade tóxica, enzimática e/ou imunológica (SKALKA & ANTONI, 1970).

A energia liberada pela radiação ionizante inativa materiais biológicos de duas maneiras: através de um efeito direto, que ocorre quando a ionização é produzida diretamente na molécula, acontecendo sempre que um composto é irradiado em estado seco, ou ainda através de um efeito indireto, que ocorre quando um composto é irradiado em solução. O efeito indireto é o resultado da ação direta da radiação, somado às ionizações que ocorrem entre a molécula estudada (por exemplo uma proteína) e os produtos resultantes da interação da radiação com a água ou outros solventes. No caso da água, estes são conhecidos como produtos da radiólise da água, cujas principais espécies reativas formadas são: OH^\bullet , e^-_{aq} , H^\bullet , H_2O_2 , H_2 . O agente oxidante, radical hidroxila (OH^\bullet) e os agentes redutores, elétron aquoso (e^-_{aq}) e hidrogênio (H^\bullet), destacam-se entre as demais espécies por serem altamente reativos e apresentarem um alto rendimento ou G, respectivamente de 2,8; 2,8 e 0,6 (G = número de moles formados ou destruídos por 100 eV de energia absorvida) (ASMUS, 1983). Estas espécies reativas são produzidas simultaneamente durante o processo de irradiação e podem sofrer numerosas reações entre si, com o gás dissolvido, ou ainda com outras moléculas em suspensão (BUTLER, 1984).

O tratamento de materiais biológicos com a radiação ionizante está sendo aplicado em várias áreas, tais como esterilização de materiais hospitalares (SKIENS, 1980), imobilização de enzimas (HARTMEIER, 1986), irradiação de alimentos

(BERNARDES, 1996), atenuação de toxinas (ROGERO & NASCIMENTO, 1995), entre outros.

No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), com a crise na produção de soros antiofídicos instalada no país no início da década de 80, iniciaram-se os estudos sobre a radiação ionizante como ferramenta na destoxicação de venenos ofídicos. Entre os estudos realizados nos últimos dez anos destacam-se os trabalhos de MURATA (1988); NASCIMENTO (1991); MURATA et al. (1992); GUARNIERI (1992); SOUZA-FILHO et al. (1992); SPENCER (1995); ANDRIANI (1995); CARDI (1995); PAULA (1995); ROGERO & NASCIMENTO (1995); NASCIMENTO et al. (1996) entre outros.

1.5 RADIAÇÃO GAMA COMO AGENTE ATENUANTE

DALE (1942) foi o primeiro a demonstrar que enzimas puras, quando em soluções muito diluídas, são inativadas pela exposição da ordem de 0,1 kGy à radiação ionizante, enquanto são necessárias exposições de 10,0 kGy ou mais, para inativar preparações em estado seco, ou enzimas em soluções contendo outros componentes [no Sistema Internacional de Unidades, Gray é definido como a unidade de dose de radiação absorvida. Um Gray é igual a 1 joule de energia depositado em um quilograma de matéria pela radiação ionizante (LATARJET, 1995)].

Em um dos trabalhos pioneiros sobre atenuação de venenos pela radiação, FLOWERS (1963) estudou os efeitos dos raios X nas atividades biológicas do veneno de *Agkistrodon piscivorus* – o qual possui enzimas capazes de causar grandes danos teciduais no local da picada. O autor verificou que a reatividade local do veneno irradiado (em solução) foi reduzida consideravelmente, em cerca de 65%, bem como seu efeito letal.

SALAFRANCA (1973) atenuou o veneno de Cobra (*Naja naja philipinensis*) utilizando a radiação gama. O veneno em solução foi submetido às doses de 2,5, 5,0 e 10,0 kGy. Foi observada uma atenuação crescente, conforme o aumento da dose (83%, 66% e 43% respectivamente menos tóxicos que o veneno não irradiado). O veneno que recebeu 10,0 kGy apresentou suas propriedades imunogênicas preservadas, conforme avaliado por imunizações em coelhos. Já LAUHATIRANANDA et al. (1970) não obtiveram o mesmo sucesso com a produção de anticorpos em carneiros quando trataram o mesmo veneno com doses de radiação gama variando de 5,0 kGy a 50,0 kGy, concluindo que a antigenicidade e a toxicidade do veneno de Cobra são destruídas conforme o aumento da dose de radiação.

SUNDARAM et al. (1970) também irradiaram o veneno de *Naja naja* com raios gama e observaram uma significativa inativação da toxicidade. Os autores ressaltaram que não foram observados danos grosseiros na estrutura molecular dos componentes heterogêneos deste veneno (avaliados por estudos de absorção em ultravioleta). De modo contrário, BARIDE et al. (1980) ao irradiarem separadamente os venenos de *Naja naja*, *Bungarus cherulus*, *Echis carinatus* e *Vipera russeli*, observaram polimerização das proteínas em solução. As ligações responsáveis pela polimerização foram classificadas como fracas e estes polímeros (sem sofrer nenhum processo de purificação) induziram a formação de anticorpos neutralizantes contra os respectivos venenos.

Por outro lado, SPENCER (1995) ao irradiar o veneno de *Bothrops jararacussu* em solução com 2,0 kGy, não observou a formação de tais polímeros protéicos, corroborando os resultados de GUARNIERI (1992), com o veneno de *Bothrops jararaca* e SUNDARAM et al. (1970), citado anteriormente. A dose de 2,0 kGy sobre o veneno de *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* promove diminuição significativa das atividades enzimáticas, biológicas e tóxicas, assim como manutenção das propriedades antigênicas e da capacidade de induzir a formação de

anticorpos, sendo estes mais eficientes na neutralização das atividades tóxicas do que os induzidos pelo veneno nativo (GUARNIERI, 1992 e SPENCER, 1995).

Corroborando os resultados observados por BARIDE et al. (1980) e discordando dos observados por SPENCER (1995), GUARNIERI (1992) e SUNDARAM et al. (1970), MURATA (1988) verificou a ocorrência de precipitação das proteínas em solução ao estudar os efeitos de doses crescentes de radiação gama (0,75 a 2,0 kGy) sobre o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Esta perda parcial das proteínas sucedeu de forma crescente a partir de 0,75 kGy, chegando a haver uma precipitação de quase 50% com a dose de 2,0 kGy. Após sofrerem um processo de separação, as proteínas solúveis irradiadas com esta dose apresentaram-se 4,5 vezes menos tóxicas que o veneno nativo e foram capazes de induzir a formação de anticorpos bastante eficientes na neutralização da atividade tóxica do veneno crotálico (MURATA et al., 1992).

Devido ao fato de os venenos de serpentes serem constituídos por misturas complexas de proteínas e outros componentes, durante a irradiação pode ocorrer uma proteção mútua dos compostos em solução, diminuindo consideravelmente os efeitos da radiação sobre seus componentes. Logo, o estudo de toxinas ou proteínas isoladas, objetivando elucidar a ação dos raios gama na detoxicação de venenos, apresenta vantagens sobre o estudo do veneno total (SKALKA & ANTONI, 1970).

Assim a crotoxina, por corresponder a cerca de 60% do peso seco do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e ser a sua toxina mais letal, apresenta-se como modelo ideal no estudo dos efeitos da radiação gama sobre este.

SOUZA FILHO (1992), estudando o processo de atenuação da crotoxina por meio da irradiação, observou uma diminuição em sua solubilidade após a irradiação com doses de 1,5 e 2,0 kGy, indicando uma grande perda protéica devido à agregação e precipitação. Após estes compostos insolúveis terem sido retirados da solução, a

fração solúvel da crotoxina irradiada com 1,5 kGy apresentou-se 3,5 vezes menos tóxica que o veneno nativo. Esta fração manteve-se antigenicamente inalterada, sendo reconhecida, de forma similar ao veneno nativo, por um soro anticrotálico comercial em um ensaio de imunodifusão.

NASCIMENTO (1991) também irradiou a crotoxina em solução, porém acidificando o pH do meio de irradiação, observou uma manutenção na solubilidade destas proteínas, com recuperação de 100% no final do processo. Esta proteína irradiada manteve suas propriedades antigênicas e imunogênicas preservadas. Em um estudo mais detalhado sobre os principais produtos gerados pela irradiação da crotoxina, NASCIMENTO et al. (1996) observaram a formação de complexos solúveis, de alto peso molecular, passíveis de separação em coluna de exclusão molecular, os quais foram denominados “agregados”. Foram ensaiadas várias atividades destes agregados e comparadas com a crotoxina não irradiada. Os agregados mostraram-se totalmente desprovidos de atividade fosfolipásica e cerca de 40 vezes menos tóxicos do que a crotoxina nativa. Foi avaliada também a atividade imunogênica destes compostos, os quais induziram a formação de anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar a crotoxina nativa.

Diante dos resultados de NASCIMENTO et al. (1996), de que os agregados são os responsáveis pela destoxicação da crotoxina, sendo praticamente atóxicos, mas mantendo intactas suas propriedades imunogênicas e antigênicas e do fato de que a quantidade de agregados gerada pela irradiação é dose-dependente, aventou-se a hipótese de que a obtenção de altas concentrações de agregados seria uma alternativa eficiente na produção de um imunógeno ideal para o processo de soroprodução. A obtenção de agregados atóxicos e imunogênicos a partir do veneno total irradiado apresentaria a vantagem de eliminar o procedimento de purificação da crotoxina, além de estarem presentes os demais componentes do veneno crotálico durante a produção do anti-soro.

A alta letalidade de acidentes envolvendo as serpentes do gênero *Crotalus* e a necessidade de otimizar a produção de soro anticrotálico, aliadas às vantagens da irradiação como método de atenuação do veneno empregado para a imunização dos cavalos, justificam o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em:

- 1) Irradiar o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* com as doses de 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy;
- 2) Submeter o veneno irradiado ao procedimento de separação dos agregados em cromatografia de exclusão molecular;
- 3) Estabelecer uma dose ótima de radiação, que seja capaz de gerar altas concentrações de agregados atóxicos e imunogênicos;
- 4) Avaliar a eficiência dos anticorpos obtidos a partir dos agregados, quanto à capacidade de neutralizar a atividade tóxica do veneno crotálico nativo.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Camundongos: Foram usados camundongos Swiss de ambos os sexos, com peso acima de 18 gramas, criados e mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/SP.

Coelhos: Foram usados coelhos fêmeas, pesando entre 3 e 4 quilogramas, criados no biotério do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP - Botucatu) e mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/SP.

3.1.2 Veneno

O veneno utilizado foi cedido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Nos foi fornecido um veneno crotamino-positivo de referência nacional, extraído das serpentes pertencentes à subespécie *Crotalus durissus terrificus*, na forma liofilizada. Este veneno foi conservado a -20⁰C até o momento do uso.

3.1.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró análise. A água destilada utilizada no preparo de soluções foi purificada em um aparelho Milli-Q plus-Millipore.

3.1.4 Fonte de irradiação

Foi utilizada uma fonte de ^{60}Co (Gamma Cell 220, Atomic Energy Agency of Canada), disponível no Departamento de Aplicações de Técnicas Nucleares do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN-SP.

A taxa de dose utilizada foi de 350 Gy/h. A irradiação das amostras ocorreu sempre na presença de oxigênio, a temperatura ambiente e de forma homogênea e ininterrupta.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Irradiação do veneno

O veneno crotálico na forma liofilizada foi solubilizado em uma solução de cloreto de sódio 0,15 M. Esta solução foi acidificada com ácido clorídrico (HCl) 1,0 M até o pH 3,5 e centrifugada com 17.300 g, durante 10 minutos a 4^oC em uma centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B. Foi dosada a concentração protéica do sobrenadante pelo método de BRADFORD (1976) e esta foi ajustada para 2,0 mg/ml. Foram coletadas frações de 6,0 ml em frascos de vidro e irradiadas separadamente com doses de 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy. Durante a irradiação em cada dose, foi mantida do lado de fora da fonte de ^{60}Co uma amostra preparada sob as mesmas condições para servir como controle.

3.2.2 Quantificação dos produtos da irradiação

Após as irradiações as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, durante 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante teve sua concentração protéica dosada pelo método de BRADFORD (1976). Foi feito um cálculo da quantidade média de proteína precipitada em cada dose de irradiação pela diferença entre a concentração protéica da solução antes de sofrer a irradiação (concentração inicial) e a concentração protéica das amostras irradiadas e centrifugadas (concentração final). Os experimentos de cada dose foram realizados em triplicata para o cálculo da média e desvio padrão.

Após a dosagem, os sobrenadantes foram aliquotados, congelados a -20°C e descongelados somente no momento do uso.

3.2.3 Isolamento dos agregados e das frações irradiadas não agregadas

As amostras descongeladas foram submetidas, separadamente, ao procedimento de fracionamento por exclusão molecular em coluna XK 16/100 - Pharmacia, previamente empacotada até a altura de 90 cm com gel Sephadex G-100 fine - Pharmacia (Fine Chemicals, Upsala, Swedwen) equilibrada com tampão formiato de amônio 0,1 M, pH 3,0, com um fluxo constante de 0,22 ml/min. Amostras de 1,3 ml foram coletadas em um coletor LKB - Pharmacia. A densidade óptica, em 280 nm, de cada amostra coletada foi determinada em um espectrofotômetro Pharmacia - Ultrospec 2.000 e os valores colocados em gráfico. Estimou-se então a área referente aos agregados solúveis formados em cada dose e às frações irradiadas não agregadas, por meio da integração das densidades ópticas (D.O.).

Foram realizadas também cromatografias do veneno crotálico não irradiado, ou nativo, para serem utilizadas como controle.

O volume de exclusão (V_0) da coluna cromatográfica utilizada foi calculado por meio de uma solução a 2,0 mg/ml de azul dextran (Sigma Chemical Co.) com peso molecular de 2.000.000. Esta solução foi aplicada ao sistema cromatográfico sob as mesmas condições em que foram aplicadas as amostras irradiadas e nativa.

Após a obtenção do perfil cromatográfico das amostras irradiadas, as frações referentes aos agregados e aos não agregados foram concentradas separadamente, em Speed-Vac SC 200 - Savant até o volume final de 5,0 ml e congeladas a -20°C .

3.2.4 Atividade tóxica

A determinação da toxicidade das amostras irradiadas ou não (tabela 1), foi realizada pelo cálculo da dose letal capaz de matar 50% dos animais do experimento (DL_{50}).

Para o cálculo da DL_{50} utilizou-se o protocolo descrito por AIRD & KAISER (1985), no qual foi utilizado um procedimento de “dose individual”. Os inóculos foram feitos pela via intraperitoneal, onde foram usados no mínimo 4 grupos de 4 camundongos fêmeas cada, pesando entre 25 e 35 g para cada amostra a ser avaliada. O intervalo das concentrações utilizadas e o fator de diluição para cada amostra podem ser vistos na tabela 1. A mortalidade dos animais foi acompanhada por 48 horas e a determinação da DL_{50} foi calculada utilizando-se o método de Spearman-Kärber, com um intervalo de confiança de 95%, conforme recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981).

Tabela 1: Concentrações utilizadas para o cálculo da DL₅₀ e fator de diluição.

Amostras	Intervalo das concentrações (µg/µl)	Fator de diluição
Veneno nativo	0,003 - 0,025	2,0
VTI 2,0 kGy*	0,010 - 0,080	2,0
VTI 3,0 kGy*	0,050 - 0,400	2,0
VTI 5,0 kGy*	0,185 - 1,480	2,0
VTI 10,0 kGy*	0,185 - 1,480	2,0
ASVI 2,0 kGy	0,050 - 0,80	2,0
ASVI 3,0 kGy	0,200 - 0,670	1,5
ASVI 5,0 kGy	0,200 - 1,600	2,0
ASVI 10,0 kGy	ND	-
FNAVI 2,0 kGy	0,040 - 0,120	1,5
FNAVI 3,0 kGy	0,010 - 0,080	2,0
FNAVI 5,0 kGy	0,010 - 0,080	2,0
FNAVI 10,0 kGy	ND	-

VTI = Veneno total irradiado; ASVI = Agregados solúveis do veneno irradiado; FNAVI = Fração não agregada do veneno irradiado; ND = Atividade tóxica não determinada.

* As amostras de veneno total irradiado foram utilizadas na forma bruta, sem uma separação prévia tanto dos precipitados quanto dos agregados.

3.2.5 Atividade imunogênica do veneno total irradiado

A capacidade do veneno total irradiado induzir uma resposta imune foi pesquisada por um procedimento clássico de imunização em coelhos e comparada com o veneno nativo.

Utilizou-se como antígeno veneno nativo e irradiado com as doses de 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy. Cabe ressaltar aqui que as amostras irradiadas foram utilizadas na forma bruta, sem um procedimento prévio de separação (tanto dos precipitados quanto dos agregados) e a amostra nativa encontrava-se na mesma concentração daquelas que foram submetidas à irradiação (2,0 mg/ml).

Um total de 20 coelhos fêmeas, pesando entre 3 e 4 kg, foi separado em 2 grupos contendo 10 animais cada. O primeiro grupo foi dividido em 5 subgrupos de 2 animais, de modo que cada animal de cada subgrupo recebeu 0,3 mg por inóculo dos seguintes imunógenos: veneno nativo ou irradiado nas doses citadas acima. O segundo grupo também foi dividido da mesma forma, sendo que cada animal do subgrupo recebeu 2,0 mg por inóculo dos mesmos imunógenos.

No primeiro inóculo as amostras foram diluídas em cloreto de sódio 0,15 M, emulsificadas com igual volume de adjuvante de Freund completo e inoculadas pela via intradérmica em 4 locais diferentes no dorso. No segundo e terceiro inóculos as amostras foram diluídas da mesma forma, emulsificadas com igual volume de hidróxido de alumínio e inoculadas pela via subcutânea em 1 ponto no dorso do animal. O quarto inóculo foi realizado com as amostras diluídas em cloreto de sódio 0,15 M e inoculadas pela via subcutânea. Os animais imunizados com 0,3 e 2,0 mg de antígeno por inóculo receberam respectivamente 0,3 ou 2,0 ml de solução por inóculo, com exceção do quarto inóculo que foi realizado respectivamente com 0,15 e 1,0 ml de solução. Após cada inóculo foi seguido um período de 2 semanas de descanso. O esquema de imunização pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2: Esquema de imunização dos coelhos

Semanas	Excipiente	Via de inóculo
1 ^a	Adjuvante de Freund completo	Intradérmica
3 ^a	Hidróxido de alumínio	Subcutânea
5 ^a	Hidróxido de alumínio	Subcutânea
7 ^a	Cloreto de sódio 0,15M	Subcutânea

Foram feitas sangrias semanais, a partir da quarta semana, pela veia marginal da orelha dos coelhos. O sangue foi centrifugado e o soro separado. Os soros referentes à mesma dose de radiação e à mesma quantidade de antígeno inoculada, foram reunidos e diluídos em PBS 0,15 M na proporção de 1/200 para posterior titulação. Foi realizada uma colheita prévia do soro de todos os animais para servir de controle negativo.

Para a titulação do soro dos coelhos por ELISA, microplacas Hemobag foram sensibilizadas com 100 µl de uma solução a 10 µg/ml de veneno crotálico nativo, diluído em tampão carbonato/ bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, durante 12 horas à 4^oC em câmara úmida. Após este período de incubação as placas foram lavadas três vezes com uma solução de PBS Tween 0,05%. Este procedimento de lavagem foi repetido após cada etapa do ensaio. Foi feito um bloqueio com uma solução a 1% de soroalbumina bovina durante 1 h à 37^oC. Os soros foram diluídos em solução salina tamponada (PBS) de forma seriada, partindo-se de 1/200, com um fator de diluição 2 e incubados durante 30 minutos à 37^oC em câmara úmida. IgG de ovelha anti-IgG de coelho, marcada com peroxidase serviu como segundo anticorpo, o qual foi incubado durante 30 minutos em câmara úmida à 37^oC. O o-dicloridrato de fenilenediamina (OPD), adicionado ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e diluído em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,05 M, pH 5,0 foi utilizado como substrato cromógeno, com um

tempo de incubação de 20 minutos em câmara escura. A reação foi interrompida com ácido cítrico 0,2 M e as densidades ópticas foram lidas a 450 nm em um leitor de microplacas de ELISA - Dynatech MR 4000. O título do anti-soro dos coelhos foi determinado na diluição com absorvância 2,0 vezes superior ao soro normal (soro controle dos animais não imunizados) diluído 1/100.

3.2.6 Atividade imunogênica dos agregados e não agregados

A capacidade das frações irradiadas, isoladas por cromatografia, induzirem uma resposta imune foi pesquisada em camundongos, utilizando-se novamente o procedimento clássico de imunização.

Para isto, 7 grupos de 8 camundongos machos, pesando entre 28 e 35 g, receberam os seguintes imunógenos: agregados do veneno irradiado com 2,0; 3,0 e 5,0 kGy, respectivas frações não agregadas e veneno nativo. Cada animal de cada grupo recebeu 0,007 mg dos respectivos imunógenos por inóculo (o equivalente a 2,5 DL₅₀), pela via intradérmica ou subcutânea, em 4 locais diferentes no dorso. A quantidade de antígeno injetada nos animais foi igual para todas as amostras. Foram realizados inóculos quinzenais, durante 8 semanas, sendo o primeiro inóculo com 50% de adjuvante de Freund completo, o segundo e terceiro com 50% de hidróxido de alumínio e o último com as amostras diluídas em solução de cloreto de sódio 0,15 M (tabela 3). O volume injetado nos animais foi de 0,2 ml nos três primeiros inóculos e 0,1 ml no último. A concentração das amostras a serem injetadas foi determinada conforme procedimentos de NASCIMENTO et al. (1996).

Tabela 3: Esquema de imunização dos camundongos

Semanas	Excipiente	Via de inóculo
1	Adjuvante de Freund completo	Intradérmica
3	Hidróxido de alumínio	Subcutânea
5	Hidróxido de alumínio	Subcutânea
7	Cloreto de sódio 0,15M	Subcutânea

Os animais foram sangrados semanalmente a partir do segundo inóculo pelo plexo orbital, os soros foram separados por centrifugação e quantidades iguais foram reunidas de acordo com cada grupo, antes de serem diluídos em (PBS) na proporção de 1/100.

A titulação seriada dos anticorpos séricos obtidos contra os agregados solúveis, os não agregados e o veneno nativo foi realizada conforme descrito no item 3.2.5, porém foi utilizado como anticorpo secundário IgG de ovelha anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase.

3.2.7 Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados e antifração não agregada

Na décima semana, a fim de verificar a capacidade neutralizante *in vivo* dos anticorpos produzidos nos camundongos, os animais de cada grupo de imunização foram pesados, divididos em 2 subgrupos e desafiados com 5 ou 10 DL₅₀ do veneno nativo diluído em solução de cloreto de sódio 0,15 M. A taxa de mortalidade foi registrada após 48 horas.

3.2.8 Capacidade neutralizante “in vitro” dos anticorpos antiveneno total nativo e irradiado

Para determinar o título de neutralização do anti-soro, quantidades de veneno crotálico equivalentes à 3,5 DL₅₀ (concentração final de 52 µg/ml) foram misturadas com várias diluições dos anti-soros de coelhos, obtidos contra o veneno total irradiado nas diversas doses e o veneno nativo. Esta mistura foi incubada a temperatura de 37°C por 30 minutos, resfriada e injetada pela via intraperitoneal em camundongos fêmeas na dose de 10 µl/g de camundongo. A capacidade neutralizante do anti-soro (em µg de toxina/ml de anti-soro) foi calculada conforme KAISER et al. (1986), utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Capacidade neutralizante da toxina (CNT)} = (D - DL_{50}) \times 1 \times 10^5 \times (1/V_{50}),$$

onde D = Dose total da toxina (µg/g); DL_{50} em µg/g; V_{50} = Volume de anti-soro que reduz a letalidade de 1ml da solução estoque da toxina a 50%.

3.2.9 Análise por eletroforese em SDS-PAGE

A análise das alterações estruturais causadas nas amostras irradiadas com as diversas doses e frações isoladas foi efetuada em um sistema contínuo de eletroforese, sendo formado por um gel de poliacrilamida com gradiente de concentração variando de 3% a 20%, sob condições de desnaturação.

As amostras contendo em média 30 µg de proteína foram dissolvidas em tampão de amostra contendo tris/ácido clorídrico 0,5 M, pH 6,8; 10% de glicerol; dodecil sulfato de sódio 10% e 0,05% de azul de bromofenol, sendo a seguir fervidas em banho maria por 5 minutos. O gel de resolução apresentava um gradiente de concentração de acrilamida variando de 3% a 20%, em tampão tris/ácido clorídrico 0,15 M pH 8,8. Após a corrida com uma corrente constante de 20 mA, durante 8

horas, o gel foi fixado com uma solução de ácido tricloroacético 12,5% durante 60 minutos, corado com uma solução a 0,25% de comassie brilliant blue R-250 durante 8 horas e descorado com uma solução de 10% de ácido acético e 30% de etanol.

Foram utilizados os padrões de peso molecular contendo 30µg das seguintes proteínas: lisozima, 14,3 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; ovoalbumina, 45 kDa e soroalbumina bovina 66 kDa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

4.1 Irradiação do veneno

Após a irradiação do veneno crotálico observou-se a formação de compostos insolúveis, denominados “precipitados”.

4.2 Quantificação dos produtos da irradiação

A quantidade de proteína precipitada durante a irradiação foi calculada conforme descrito anteriormente. Durante a irradiação ocorreu a precipitação de quantidades crescentes de proteínas, conforme o aumento da dose. Com 2,0; 3,0 e 5,0 kGy houve a precipitação de aproximadamente 11%, 17% e 31% das proteínas. Já a dose de 10,0 kGy foi responsável por uma precipitação praticamente total (aproximadamente 95% das proteínas em solução). A tabela 4 expressa a porcentagem de precipitados formados durante a irradiação e a concentração protéica do sobrenadante das amostras nativa e irradiadas.

Tabela 4: Quantificação dos precipitados.

Dose de irradiação	Concentração protéica do sobrenadante (mg/ml)	% de Precipitados
0 kGy	2,00	0
2,0 kGy	1,78 ± 0,05	11 ± 2,6
3,0 kGy	1,66 ± 0,19	17 ± 9,5
5,0 kGy	1,37 ± 0,05	31 ± 2,8
10,0 kGy	0,09 ± 0,02	95 ± 1,0

4.3 Isolamento dos agregados e das frações irradiadas não agregadas

O volume de eluição do azul dextran (V_0 da coluna) foi em 60 ml ou o equivalente ao tubo 43 (figura não mostrada). O perfil cromatográfico do veneno nativo (figura 1) mostra a presença dos quatro principais componentes do veneno crotálico: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina.

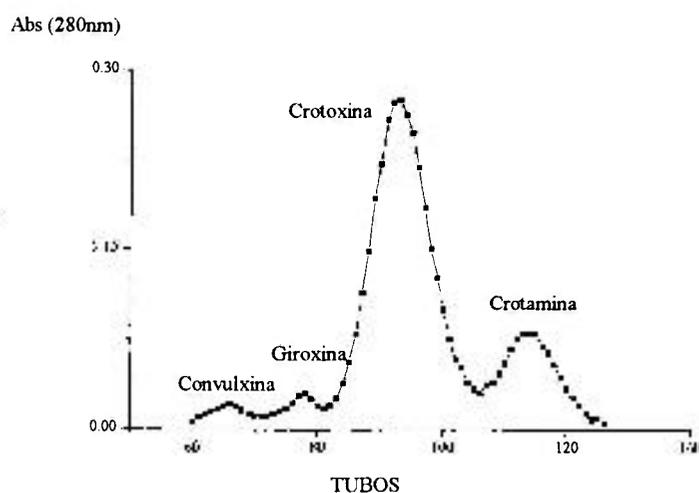


Figura 1: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* em coluna de Sephadex G-100. Quatro miligramas de veneno foram aplicados. O tampão formiato de amônio foi empregado. O volume colhido por tubo foi 1,3 ml.

O veneno que recebeu a dose de 2,0 kGy de irradiação apresentou a formação de compostos de alto peso molecular eluindo na posição do volume de exclusão (V_0) (figura 2). Estes compostos de alto peso molecular, somados aos de peso molecular variado que eluíram até o tubo 80 foram reunidos e denominados de agregados solúveis do veneno irradiado com 2,0 kGy (ASVI 2,0 kGy); estes agregados

representaram aproximadamente 51% do total das proteínas precipitadas (tabela 5). Observamos ainda a manutenção de compostos correspondentes à crotocina, entre os tubos 80 e 100 e à crotamina, entre os tubos 100 e 120. Estes foram reunidos e denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 2,0 kGy (FNAVI 2,0 kGy); esta fração representou cerca de 49% das proteínas em solução (tabela 5).

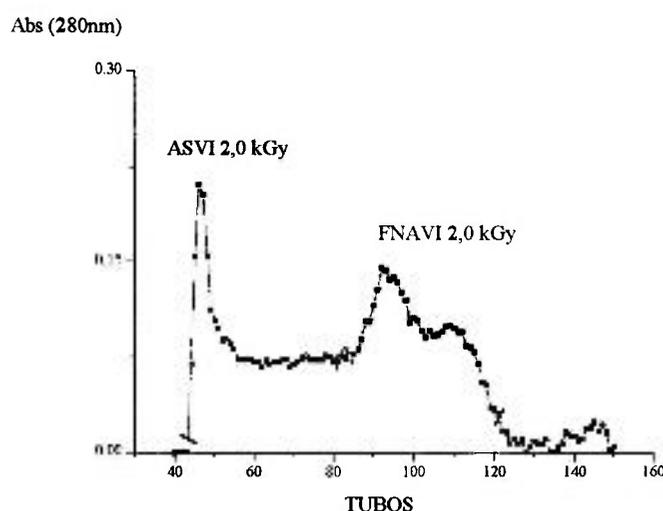


Figura 2: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 2,0 kGy, em coluna de Sephadex G-100. 6,3 mg de veneno foram aplicados. O tampão formiato de amônio foi empregado. O volume colhido por tubo foi 1,3 ml.

Nas amostras de veneno crotálico irradiadas com 3,0 kGy (figura 3) também ocorreu a formação de compostos de alto e variado peso molecular (do tubo 43 ao 80), denominados de agregados solúveis do veneno irradiado com 3,0 kGy e, embora com uma absorbância consideravelmente mais baixa quando comparada ao veneno nativo, houve uma relativa manutenção dos compostos correspondentes à crotocina e

crotamina (entre os tubos 80 e 117), denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 3,0 kGy; estas frações correspondem respectivamente a 61% e 39% do total das proteínas presentes em solução após a irradiação (estimada pela integração total das densidades ópticas de cada tubo - tabela 5).

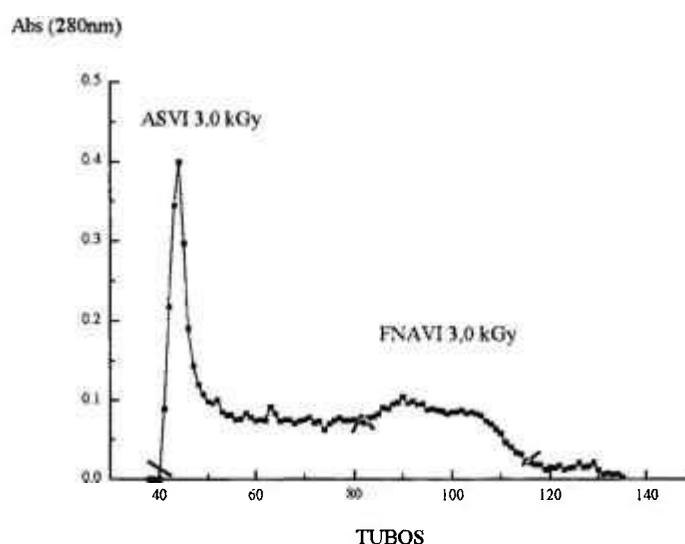


Figura 3: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 3,0 kGy, em coluna de Sephadex G-100. 5,6 mg de veneno foram aplicados. O tampão formiato de amônio foi empregado. O volume colhido por tubo foi 1,3 ml.

Com a dose de 5,0 kGy (figura 4) houve a formação praticamente exclusiva dos agregados de alto e variado peso molecular, reunidos até o tubo 80 e denominados de agregados solúveis do veneno irradiado com 5,0 kGy. Não foi observada a manutenção dos compostos correspondentes à crotaxina e crotamina, mas ainda assim os tubos referentes a estas frações foram reunidos e denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 5,0 kGy para posterior ensaio das atividades tóxica

e imunogênica; estas frações corresponderam respectivamente a 88% e 12% do total das proteínas presentes em solução após a irradiação, conforme pode ser observado na tabela 5.

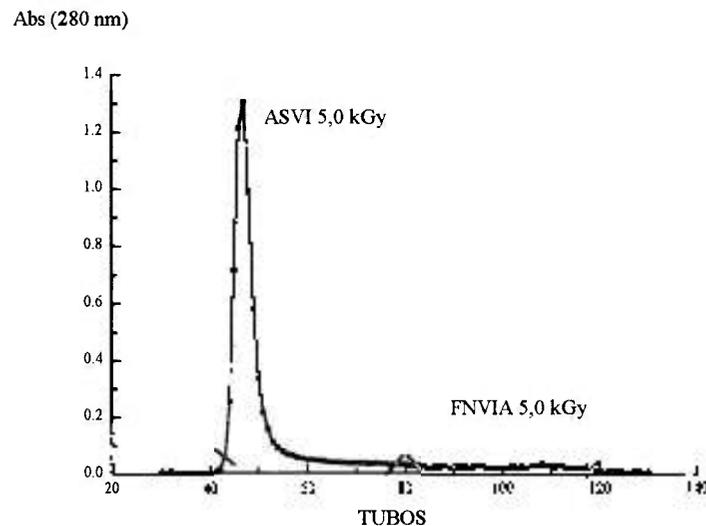


Figura 4: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 5,0 kGy, em coluna de Sephadex G-100. 4,9 mg de veneno foram aplicados. O tampão formiato de amônio foi empregado. O volume colhido por tubo foi 1,3 ml.

O perfil cromatográfico das amostras do veneno irradiado com 10,0 kGy pode ser observado na figura 5. Esta dose de irradiação foi responsável por uma precipitação de aproximadamente 95% das proteínas em solução, sendo a quantidade de proteínas recuperadas no final do processo de fracionamento insuficiente para ser submetida aos ensaios de atividade tóxica e neutralizante. Ainda assim podemos observar que o padrão dos agregados solúveis, eluindo no V_0 da coluna, foi mantido.

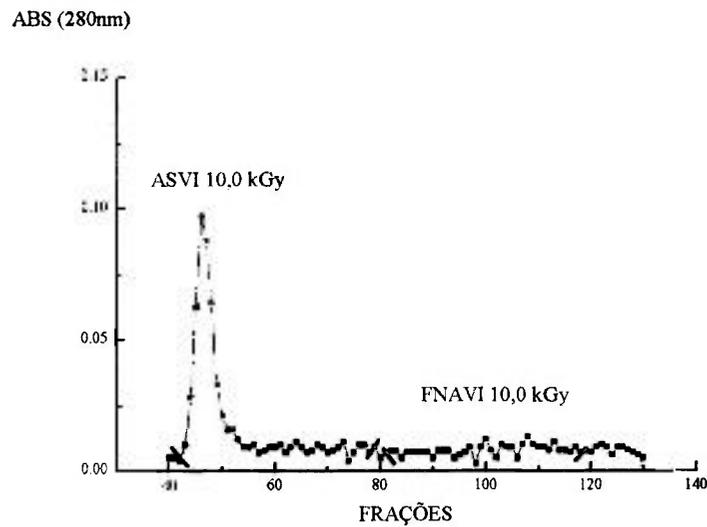


Figura 5: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 10,0 kGy, em coluna de Sephadex G-100. 0,4 mg de veneno foram aplicados. O tampão formiato de amônio foi empregado. O volume colhido por tubo foi 1,3 ml.

Tabela 5: Estimativa das áreas relativas às frações agregadas e não agregadas.

Dose de irradiação	% de ASVI	% de FNAVI
2,0 kGy	51 (\pm 3,10)*	49 (\pm 3,05)*
3,0 kGy	61 (\pm 1,93)	39 (\pm 1,94)
5,0 kGy	88 (\pm 0,38)	12 (\pm 0,36)
10,0 kGy	67 (\pm 0,38)	33 (\pm 0,36)

ASVI = Agregados solúveis do veneno irradiado; FNAVI = Fração não agregada do veneno irradiado.

* Média (\pm desvio padrão)

4.4 Atividade tóxica

As tabelas 6 a 16 indicam as quantidades de amostras utilizadas na determinação da toxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado e das demais frações isoladas, juntamente com as concentrações das soluções e a taxa de mortalidade (expressa em nº de camundongos mortos/ nº de camundongos utilizados no experimento).

Tabela 6: Determinação da toxicidade do veneno de *C.d. terrificus*.

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,03125	0/4
0,0625	0/4
0,125	1/4
0,25	4/4

Tabela 7: Determinação da toxicidade do veneno total irradiado com 2,0 kGy.

Quantidade($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,10	0/4
0,20	0/4
0,40	2/4
0,80	4/4

Tabela 8: Determinação da toxicidade do veneno total irradiado com 3,0 kGy.

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,50	0/4
1,00	0/4
2,00	2/4
4,00	4/4

Tabela 9: Determinação da toxicidade do veneno total irradiado com 5,0 kGy.

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
1,85	0/4
3,70	0/4
7,40	0/4
14,80	0/4

Tabela 10: Determinação da toxicidade do veneno total irradiado com 10,0 kGy.

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
1,85	0/4
3,70	0/4
7,40	0/4
14,80	0/4

Tabela 11: Determinação da toxicidade dos **agregados solúveis do veneno irradiado com 2,0 kGy.**

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,50	0/4
1,00	0/4
2,00	2/4
4,00	3/4
8,00	4/4

Tabela 12: Determinação da toxicidade dos **agregados solúveis do veneno irradiado com 3,0 kGy.**

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
2,00	0/4
3,00	3/4
4,50	4/4
6,75	4/4

Tabela 13: Determinação da toxicidade dos **agregados solúveis do veneno irradiado com 5,0 kGy.**

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
2,00	0/4
4,00	0/4
8,00	3/4
16,00	4/4

Tabela 14: Determinação da toxicidade da **fração não agregada do veneno irradiado com 2,0 kGy.**

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,40	0/4
0,60	2/4
0,80	4/4
1,20	4/4

Tabela 15: Determinação da toxicidade da **fração não agregada do veneno irradiado com 3,0 kGy.**

Quantidade($\mu\text{g/g}$)	Taxa de mortalidade
	48 horas
0,10	0/4
0,20	0/4
0,40	0/4
0,80	0/4

Tabela 16: Determinação da toxicidade da **fração não agregada do veneno irradiado com 5,0 kGy.**

Quantidade ($\mu\text{g/g}$)	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Taxa de mortalidade	
		24 horas	48 horas
0,10	0,01	0/4	0/4
0,20	0,02	0/4	0/4
0,40	0,04	0/4	0/4
0,80	0,08	0/4	0/4

As amostras de veneno total irradiado com 2,0 e 3,0 kGy apresentaram sua toxicidade atenuada em 2,7 e 13,5 vezes, respectivamente; enquanto as amostras irradiadas com 5,0 e 10,0 kGy apresentaram-se pelo menos 100 vezes menos tóxicas que o veneno nativo. Os agregados e as frações não agregadas também apresentaram a toxicidade atenuada à medida que a dose de irradiação aumentou. Na tabela 17

podemos observar os resultados de DL_{50} das amostras, calculados pelo método de SPEARMAN-KARBER com um intervalo de confiança de 95% (WHO, 1981).

Tabela 17: Atividades tóxicas dos venenos nativo, irradiado e frações isoladas.

Amostras	DL_{50} ($\mu\text{g/g}$)	Toxicidade relativa
Veneno Nativo	0,148 (0,258 - 0,085)	1,0
VTI 2,0 kGy	0,40 (0,76 - 0,21)	2,7
VTI 3,0 kGy	2,00 (3,8 - 1,5)	13,5
VTI 5,0 kGy	>14,8	>100
VTI 10,0 kGy	>14,8	>100
ASVI 2,0 kGy	2,38 (6,9 - 0,8)	15,8
ASVI 3,0 kGy	2,71 (3,41- 2,14)	18,3
ASVI 5,0 kGy	6,72 (11,7- 3,8)	45,4
FNAVI 2,0 kGy	0,53 (0,4 - 1,4)	3,5
FNAVI 3,0 kGy	>0,8	>5,4
FNAVI 5,0 kGy	>0,8	>5,4

VTI = Veneno total irradiado; ASVI = Agregados solúveis do veneno irradiado; FNAVI = Fração não agregada do veneno irradiado.

4.5 Atividade imunogênica do veneno total irradiado

A atividade imunogênica do veneno total irradiado e nativo foi testada em coelhos e avaliada através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme descrito anteriormente. O acompanhamento da produção de anticorpos do grupo que recebeu 0,3 e 2,0 mg de imunógeno por inóculo pode ser observado nas figuras 6 e 7 respectivamente. Podemos observar que os animais que receberam 0,3 mg/inóculo do

veneno nativo e irradiado com 2,0 e 3,0 kGy apresentaram um padrão de produção de anticorpos semelhante até a sétima semana, diferindo consideravelmente o título de anticorpos na última semana da imunização. Tanto o veneno irradiado com 5,0 kGy quanto o irradiado com 10,0 kGy mostraram-se ineficientes na produção de anticorpos (figura 6).

Na figura 7 podemos observar a produção de anticorpos pelos animais que receberam grandes quantidades de antígeno por inóculo (2,0 mg/inóculo). Foi observado um padrão semelhante nos animais que receberam o veneno nativo e o irradiado com 2,0 e 5,0 kGy, sendo que naqueles animais que receberam 3,0 e 10,0 kGy, a produção de anticorpos eficientes no reconhecimento do veneno nativo foi bastante inferior.

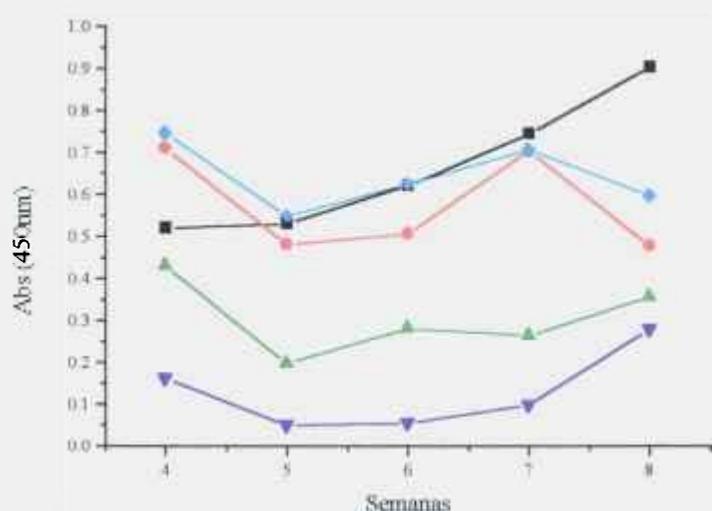


Figura 6: Produção de anticorpos séricos capazes de reconhecer o veneno crotálico nativo em coelhos imunizados com 0,3 mg dos seguintes imunógenos: (-■-) veneno total irradiado com 2,0 kGy; (-●-) veneno total irradiado com 3,0 kGy; (-▲-) veneno total irradiado com 5,0 kGy; (-▼-) veneno total irradiado com 10,0 kGy; (-◆-) veneno total nativo. Diluição do soro: 1/1.600

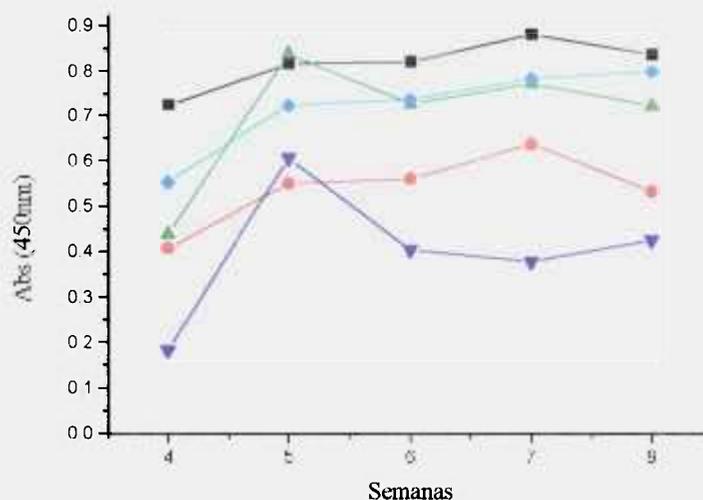


Figura 7: Produção de anticorpos séricos capazes de reconhecer o veneno crotálico nativo em coelhos imunizados com 2,0 mg dos seguintes imunógenos: (-■-) veneno total irradiado com 2,0 kGy; (-●-) veneno total irradiado com 3,0 kGy; (-▲-) veneno total irradiado com 5,0 kGy; (-▼-) veneno total irradiado com 10,0 kGy; (-◆-) veneno total nativo. Diluição do soro: 1/1.600.

A titulação de anticorpos presentes nos soros obtidos durante a última semana de imunização (oitava semana), tanto para os animais que receberam 0,3 quanto 2,0 mg/inóculo de antígeno, indicou que o veneno total irradiado com 2,0 kGy produziu maiores títulos de anticorpos capazes de reconhecer o veneno nativo do que o próprio veneno nativo, enquanto o veneno irradiado com 3,0, 5,0 e 10,0 kGy não foram eficientes na produção de altos títulos (figuras 8 e 9).

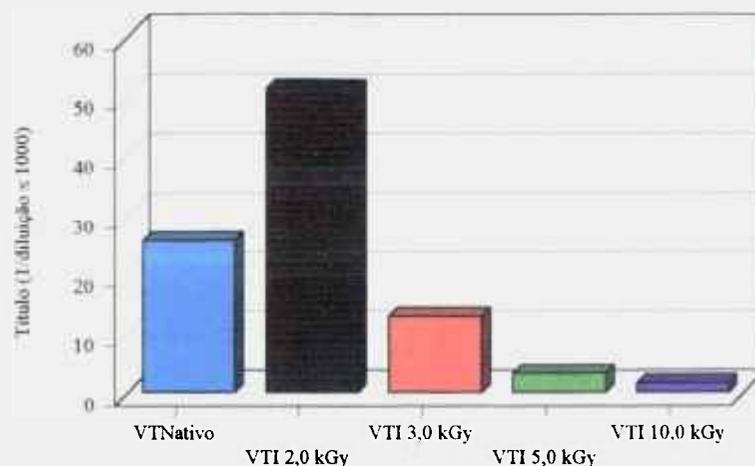


Figura 8: Título de anticorpos séricos em coelhos imunizados com 0,3 mg de antígeno por inóculo.

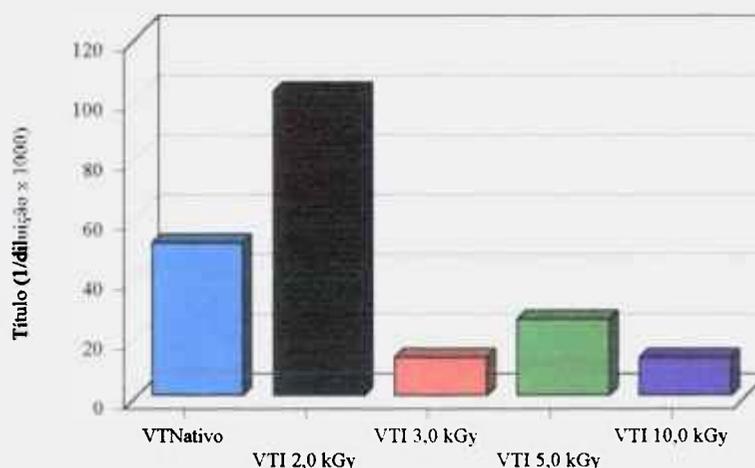


Figura 9: Título de anticorpos séricos em coelhos imunizados com 2,0 mg de antígeno por inóculo.

4.6 Atividade imunogênica dos agregados e não agregados

A atividade imunogênica das frações agregadas e não agregadas, irradiadas com as doses de 2,0, 3,0 e 5,0 kGy foi avaliada em camundongos e comparada à

atividade imunogênica do veneno nativo, conforme descrito anteriormente. O acompanhamento da produção de anticorpos nos 7 grupos imunizados pode ser observado na figura 10.

O veneno nativo, os agregados e os não agregados produzidos com 2,0 kGy comportaram-se de maneira similar durante a imunização, apresentando estes últimos, a manutenção da capacidade de induzir a formação de anticorpos que reconhecem o veneno nativo. Já os agregados e não agregados do veneno irradiado com 3,0 e 5,0 kGy apresentaram baixos títulos de anticorpos capazes de reconhecer o veneno nativo de *C. d. terrificus*.

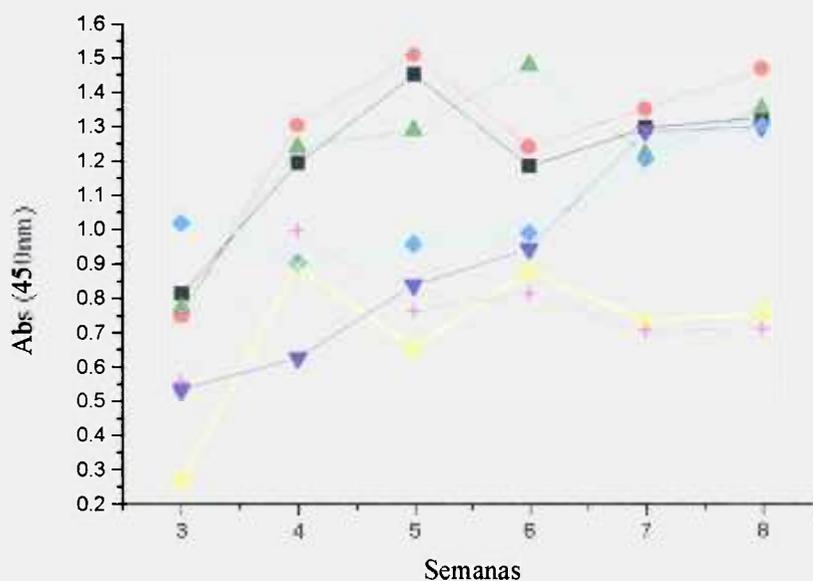


Figura 10: Produção de anticorpos capazes de reconhecer o veneno crotálico nativo em camundongos imunizados com os seguintes antígenos: (-■-) Veneno total nativo; (-●-) ASVI com 2,0 kGy; (-▲-) FNAVI de 2,0 kGy; (-▽-) ASVI com 3,0 kGy; (-◆-) FNAVI com 3,0 kGy; (-+-) ASVI com 5,0 kGy; (-* -) FNAVI com 5,0 kGy. Diluição do soro: 1/800.

4.7 Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados e antifração não agregada

Três semanas após o último inóculo das frações agregadas e não agregadas foi avaliada a capacidade neutralizante *in vivo* dos anticorpos produzidos nos camundongos. Os resultados podem ser vistos na tabela 18 que expressa a porcentagem de camundongos, por grupo, sobreviventes ao desafio de 5 DL₅₀ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e o título do “pool” dos soros de cada grupo.

Observando-se a sobrevivência dos animais após o desafio, notamos que aqueles imunizados com o veneno nativo e frações do veneno irradiado com 2,0 kGy, ao receberem o desafio de 5 DL₅₀ apresentaram a mesma porcentagem de sobrevivência (66%). Os animais imunizados com os agregados do veneno irradiado com 5,0 kGy e os não agregados do veneno irradiado com 3,0 e 5,0 kGy não sobreviveram ao desafio de 5 DL₅₀. Nenhum dos animais imunizados sobreviveu ao desafio de 10 DL₅₀.

Tabela 18: Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados, antifração não agregada e antiveneno nativo.

Imunógeno	Sobrevida (5 DL ₅₀)	Título (1/diluição)
VTN	66%	25.600
ASVI 2,0 kGy	66%	25.600
ASVI 3,0 kGy	33%	25.600
ASVI 5,0 kGy	0%	12.800
FNAVI 2,0 kGy	66%	25.600
FNAVI 3,0 kGy	0%	25.600
FNAVI 5,0 kGy	0%	12.800

VTN = Veneno total nativo; ASVI = Agregados solúveis do veneno irradiado; FNAVI = fração não agregada do veneno irradiado.

Foram utilizados 4 animais por grupo. O experimento foi repetido 2 vezes. A sobrevivência foi avaliada após 48 horas.

4.8 Capacidade neutralizante “in vitro” dos anticorpos antiveneno total nativo e irradiado

Foi avaliada a capacidade neutralizante dos anti-soros antiveneno nativo e antiveneno irradiado, obtidos em coelhos.

Os anticorpos produzidos em animais imunizados com 0,3 mg de veneno nativo ou irradiado com as diferentes doses não se mostraram eficientes na neutralização da atividade tóxica deste veneno. Foi verificada até a concentração máxima de 300 µl de soro por ml de solução estoque da toxina (52 µg/ml), não apresentando nenhum sinal de neutralização na atividade tóxica deste veneno. O mesmo foi observado com os anticorpos produzidos em animais imunizados com 2,0 mg de veneno irradiado com as doses de 3,0, 5,0 e 10,0 kGy (tabela 19). No entanto os anticorpos obtidos contra o veneno nativo e o veneno irradiado com 2,0 kGy mostraram-se bastante eficientes na neutralização da atividade tóxica do veneno crotálico (tabela 19 e figura 11). O cálculo da capacidade neutralizante da toxina (CNT) foi realizado, segundo KAISER et al. (1986), conforme a equação citada no item 3.2.8 em Métodos. Para o soro antiveneno irradiado com 2,0 kGy, por exemplo, o cálculo foi realizado da seguinte forma:

$$CNT = (D - DL_{50}) \times 1 \times 10^5 \times 1/V_{50}$$

$$CNT = (0,52 - 0,148) \times 1 \times 10^5 \times 1/125$$

$$CNT = 297,6 \mu\text{g de veneno/ml de anti-soro.}$$

Para um camundongo de 20 g, por exemplo, uma DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é 2,96 µg de veneno. Portanto, $297/2,96 = 100DL_{50}$

Sendo assim, o anti-soro contra o veneno irradiado com 2,0 kGy foi capaz de neutralizar cerca de 297 µg de veneno por ml de soro, enquanto o anti-soro contra o

veneno nativo neutralizou 165 μg de veneno por ml de soro, o equivalente a 100 e 55 DL_{50} respectivamente.

Tabela 19: Capacidade neutralizante “in vitro” dos anticorpos antiveneno total irradiado e nativo

Anti-Soros*	V_{50} (μl de soro)**
Anti veneno nativo (0,3mg)	> 300
Anti VTI 2,0 kGy (0,3mg)	>300
Anti VTI 3,0 kGy (0,3mg)	>300
Anti VTI 5,0 kGy (0,3mg)	>300
Anti VTI 10,0 kGy (0,3mg)	>300
Anti veneno nativo (2mg)	225
Anti VTI 2,0 kGy (2mg)	125
Anti VTI 3,0 kGy (2mg)	>300
Anti VTI 5,0 kGy (2mg)	>300
Anti VTI 10,0 kGy (2mg)	>300

Anti VTI = Antiveneno total irradiado.

*Os valores representados entre parênteses indicam a quantidade de imunógeno por inóculo no procedimento de imunização dos coelhos.

** V_{50} representa o volume (em μl) de anti-soro necessários para reduzir a letalidade de 1 ml de uma solução contendo 52 μg de veneno crotálico à 50% (V_{50}).

O experimento foi realizado em camundongos fêmeas, sendo que cada grupo era constituído por 4 animais.

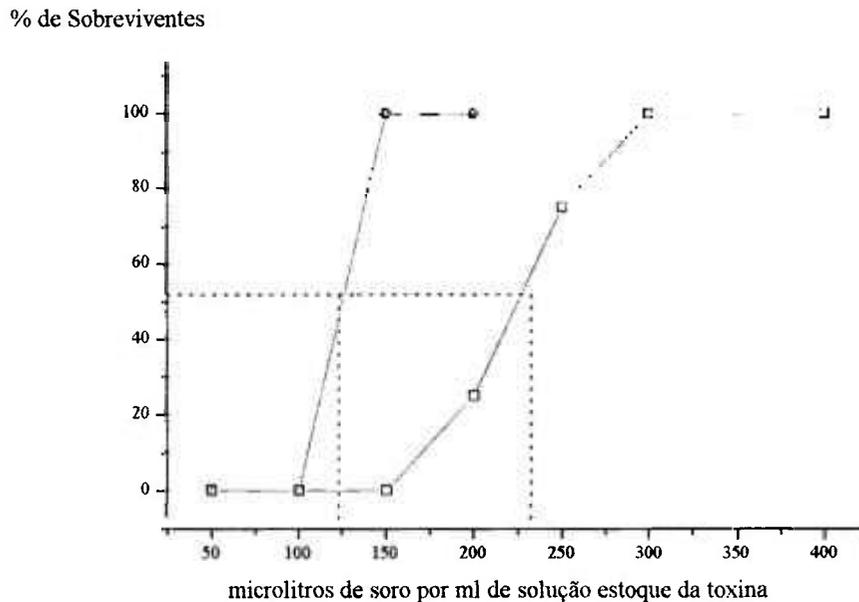


Figura 11: Neutralização da atividade letal do veneno crotálico pelo anti-soro obtido em coelhos contra o veneno nativo (-□-) e irradiado com 2,0 kGy (-○-).

4.9 Análise por eletroforese em SDS-PAGE

A análise eletroforética realizada com as amostras irradiadas mostrou que houve uma destruição significativa das proteínas de alto peso molecular presentes neste veneno, como a convulxina e a giroxina, não sendo observadas as respectivas bandas nas amostras de veneno irradiado mesmo com baixas doses. Por outro lado, houve manutenção dos compostos de peso molecular abaixo de 24 kDa, como a crotovina, que se dissociou em fosfolipase A_2 e crotapotina sob condições denaturantes, e a crotamina. Pode-se ainda observar a formação de um “arraste” na região de alto peso molecular, demonstrando a presença dos agregados gerados durante o processo de irradiação do veneno crotálico (figura 12).

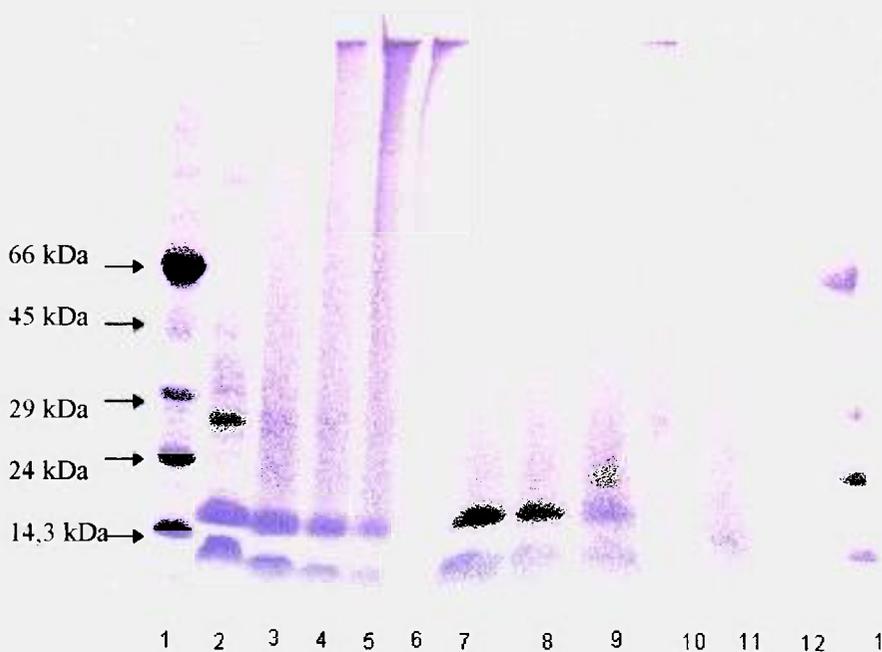


Fig.12: SDS-PAGE em gradiente de concentração de 3 a 20%. Coloração: Coomassie Blue G-250; padrões de peso molecular: lisozima 14,3 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; soroalbumina bovina 66 kDa.

- Amostras:
- 1) Padrões de peso molecular
 - 2) Veneno crotálico nativo
 - 3) Veneno crotálico irradiado com 2,0 kGy
 - 4) Veneno crotálico irradiado com 3,0 kGy
 - 5) Veneno crotálico irradiado com 5,0 kGy
 - 6) Veneno crotálico irradiado com 10,0 kGy
 - 7) Fração não agregada do veneno irradiado com 2,0 kGy
 - 8) Fração não agregada do veneno irradiado com 3,0 kGy
 - 9) Fração não agregada do veneno irradiado com 5,0 kGy
 - 10) Agregados do veneno irradiado com 2,0 kGy
 - 11) Agregados do veneno irradiado com 3,0 kGy
 - 12) Agregados do veneno irradiado com 5,0 kGy

Após altas doses de radiação, as proteínas tendem a formar agregados e a precipitar (SKALKA & ANTONI, 1970). YAMAMOTO (1977) sugere que a agregação radioinduzida de proteínas se inicie com a formação de radicais em resíduos de aminoácidos específicos, como aqueles contendo anéis aromáticos. KUME & MATSUDA (1995), ao irradiarem a soroalbumina bovina e a ovoalbumina separadamente, observaram um aumento na massa molecular das proteínas irradiadas, destruição da estrutura secundária e diminuição na hidrofobicidade de superfície, decorrentes de mudanças conformacionais que ocorrem durante a irradiação. Os autores sugerem que os resíduos hidrofóbicos, que antes estavam encerrados no interior da molécula, tornam-se expostos e são facilmente atacados pelas espécies reativas formadas durante a radiólise da água, diminuindo assim sua hidrofobicidade.

A natureza das ligações químicas envolvidas no processo de agregação ainda não foi determinada exatamente. As proteínas irradiadas podem formar ligações covalentes intermoleculares que contribuem para a sua precipitação como agregados (BUTLER et al. 1984). HAJOST & DELLINCÉE (1983) e CHUANG, et al. (1990), estudando ribonuclease e colágeno, respectivamente, evidenciaram a existência de ligações covalentes entre as ligações cruzadas dos agregados, sendo 40 a 45% das covalentes consistindo em pontes dissulfeto. BARIDE et al. (1980) concluíram que os agregados detectados nos venenos irradiados de serpentes indianas eram formados por ligações fracas; enquanto SCHUSSLER & HERGET (1980) observaram que na ausência de oxigênio os complexos protéicos eram formados tanto por ligações covalentes quanto por ligações fracas.

GUARNIERI (1992) analisando os efeitos de doses crescentes de radiação no veneno de *Bothrops jararaca* em solução salina a uma concentração de 2,0 mg/ml não

observou precipitação, mas verificou que ocorreu a formação de agregados protéicos solúveis nas amostras irradiadas, proporcionalmente ao aumento da dose. Quando o veneno de *Bothrops jararacussu* foi irradiado nas mesmas condições, também não foi observada a precipitação das proteínas, mas sim a formação de agregados em solução (SPENCER, 1995).

SOUZA-FILHO et al. (1992) e MURATA (1988) observaram a precipitação de 59% e 65% respectivamente de crotoxina e veneno total de *Crotalus durissus terrificus* irradiados com a dose de 2,0 kGy na concentração de 2,0 mg/ml, enquanto NASCIMENTO (1991) conseguiu inibir a precipitação da crotoxina irradiada nas mesmas condições, acidificando o meio de irradiação. Em todos os estudos, porém, foi observada a formação de agregados protéicos solúveis após a irradiação.

BUTLER et al. (1984), em uma revisão sobre os mecanismos químicos dos efeitos de radiações de alta energia em sistemas biológicos, relatam a importância dos agregados protéicos gerados pela irradiação, na contribuição para a perda de atividade das proteínas.

Estudos associando a técnica de irradiação à atenuação da toxicidade de venenos ofídicos, ou de toxinas isoladas são numerosos (SUNDARAM et al. 1970; BARIDE, et al. 1980; MURATA, 1988; NASCIMENTO, 1991; GUARNIERI, 1992; SOUZA-FILHO et al., 1992; SPENCER, 1995, entre outros); no entanto, NASCIMENTO et al. (1996) foram os primeiros a atribuir aos agregados gerados durante a irradiação da crotoxina a responsabilidade pela sua destoxicação.

Sabendo-se que a irradiação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* com 2,0 kGy causa precipitação das proteínas em solução, conforme observado por MURATA (1988), no presente trabalho o mesmo veneno foi irradiado em meio ácido, com o intuito de evitar tal precipitação, de acordo com os resultados obtidos por NASCIMENTO (1991). No entanto, a irradiação do veneno nestas condições não foi

suficiente para evitar a insolubilização das proteínas, pois aproximadamente 11%, 17%, 31% e 95% das proteínas irradiadas com 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy respectivamente, precipitaram.

Diante da inesperada perda das proteínas solúveis após a irradiação evidenciadas pela precipitação e do propósito de obter um imunógeno ideal para o processo de soroprodução, os objetivos iniciais do trabalho foram voltados para o estudo das características estruturais, tóxicas e imunológicas do veneno irradiado como um todo, contendo tanto as proteínas precipitadas e os agregados solúveis, formados durante a irradiação, como as proteínas irradiadas não agregadas.

Na análise do veneno total irradiado em SDS-PAGE com gradiente de concentração, observamos que o padrão eletroforético do veneno nativo foi alterado em função da dose de radiação recebida. Houve a formação de agregados solúveis, evidenciados por um “arraste” na região correspondente às proteínas de alto peso molecular. Nas amostras que receberam 3,0 e 5,0 kGy de irradiação, a intensidade deste “arraste” foi mais significativa do que as irradiadas com 2,0 kGy. As frações correspondentes à crotocina e crotamina no veneno nativo também foram observadas nas amostras irradiadas com 2,0, 3,0 e 5,0 kGy, embora as concentrações tenham diminuído conforme o aumento da dose de irradiação. Já a amostra irradiada com 10,0 kGy não apresentou a formação de grandes quantidades de agregados solúveis, uma vez que 95% das proteínas precipitaram. A quantidade crescente de agregados gerados durante a irradiação corrobora os resultados obtidos por GUARNIERI (1992) e MURATA (1988), ao irradiarem respectivamente o veneno botrópico e crotálico.

A DL_{50} do veneno nativo, via intraperitoneal, em camundongos fêmeas foi de 148,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, podendo variar de 258,3 a 85,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estes resultados corroboram os valores encontrados por MURATA (1988) e VITAL-BRAZIL (1972), cujas DL_{50} situam-se entre 153,0 e 190,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em camundongos fêmeas pela via intraperitoneal e 135,7 e 209,85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pela via intravenosa, respectivamente.

A DL₅₀ do veneno que recebeu 2,0 kGy de irradiação foi de 400 µg/kg, 2,7 vezes menos tóxico que o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, enquanto o veneno irradiado com 3,0 kGy apresentou uma DL₅₀ de 2.000 µg/kg, cerca de 13 vezes menos tóxico. Por outro lado, podemos inferir que as amostras de veneno que receberam as doses de 5,0 e 10,0 kGy apresentaram-se totalmente destoxicadas, uma vez que foram avaliadas quantidades 100 vezes superiores a DL₅₀ e estas apresentaram-se desprovidas de letalidade

A atividade imunogênica do veneno total irradiado foi avaliada por um esquema clássico de imunização. Foram escolhidos coelhos, por estes serem indicados para a produção de anticorpos policlonais, além de ser possível a coleta de uma grande quantidade de anti-soro (HARLOW & LANE, 1988), o que possibilitou a realização dos ensaios *in vitro* da capacidade neutralizante dos anticorpos.

Tanto o veneno total irradiado com 2,0 kGy como o veneno nativo induziram melhor resposta imunológica nos animais que receberam concentrações baixas (0,3 mg/inóculo), ou altas (2,0 mg/inóculo) de antígeno, quando comparados aos venenos irradiados com as doses de 3,0, 5,0 e 10,0 kGy. Entre os animais que receberam 2,0 mg de antígeno/inóculo, aqueles imunizados com o veneno irradiado com 2,0 kGy produziram maior título de anticorpos que reconhecem o veneno crotálico (testados por ELISA) do que os animais imunizados com o veneno nativo, sendo o título de aproximadamente 1/100.000 e 1/50.000 respectivamente. Estes resultados corroboram os obtidos por PAULA (1995) que também verificou o aumento do nível sérico de anticorpos induzidos por veneno crotálico e crotóxina irradiados, quando comparados com os anticorpos induzidos pelos respectivos antígenos não irradiados. Ainda no mesmo trabalho a autora sugere que os anti-soros induzidos por toxinas irradiadas são mais espécie-específicos do que o soro anticrotálico comercial.

Os anticorpos antiveneno irradiado com 2,0 kGy mostraram-se mais eficientes na neutralização da letalidade induzida pelo veneno crotálico do que os anticorpos

antiveneno nativo quando avaliados por um ensaio “in vitro”. Somente estes dois antivenenos apresentaram-se eficientes na neutralização letalidade induzida pelo veneno nativo, não sendo observada tal neutralização por nenhum outro soro obtido nos coelhos, até a máxima quantidade submetida ao ensaio de neutralização (300 µl de soro por 52 µg de toxina). Os últimos resultados fortalecem aqueles obtidos por GUARNIERI (1992), nos quais foi verificado que altas doses de radiação sobre o veneno botrópico destroem suas propriedades imunogênicas e antigênicas.

Os dois animais que receberam 2,0 mg/inóculo de veneno crotálico nativo sobreviveram durante todo o experimento de imunização, embora estes tenham apresentado alguns sinais de alterações de saúde como emagrecimento e apatia. Estes resultados não corroboram os obtidos por DANIEL et al. (1987), que imunizaram 5 coelhos com 25 µg de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* para cada animal por inóculo e, destes, 3 faleceram durante o curso de imunização com sinais de envenenamento.

Os resultados iniciais sugerem que o veneno total irradiado com 2,0 kGy apresenta vantagens sobre o veneno nativo durante o procedimento de imunização. Entretanto, o objetivo principal deste trabalho centralizava-se na busca de uma dose de radiação sobre o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* que fosse eficiente em produzir altas concentrações de agregados solúveis atóxicos e capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes da toxicidade do veneno crotálico. Neste sentido estudamos apenas a parte solúvel das amostras irradiadas.

As amostras de veneno irradiadas com todas as doses, foram submetidas ao procedimento de fracionamento em coluna de exclusão molecular dos agregados solúveis e das frações irradiadas não agregadas, com as quais foram realizados os ensaios da atividade tóxica e imunogênica. A atividade imunogênica das frações foi avaliada em camundongos por dispormos de pequenas quantidades de antígeno.

NASCIMENTO et al. (1996), ao irradiarem a crotoxina com 2,0 kGy e submetê-la ao procedimento de separação em coluna de exclusão molecular, observaram a formação de 2 frações distintas: os agregados, praticamente atóxicos e ainda imunogênicos e a crotoxina irradiada sem agregados, a qual manteve intactas as principais características da toxina nativa, toxicidade e atividade fosfolipásica. No presente trabalho, quando o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi irradiado com a dose de 2,0 kGy e submetido ao procedimento de separação em exclusão molecular, também foi observada a formação de duas frações, embora não muito bem definidas. A primeira, correspondente aos compostos de alto e variado peso molecular (os agregados solúveis) e a segunda, correspondente à fração não agregada, equivalente à crotoxina e crotamina (com volume de eluição semelhante ao obtido no perfil cromatográfico do veneno nativo e alta atividade tóxica). Excluindo-se a dose de 10,0 kGy, por ter havido grande perda das proteínas em solução, foi possível isolar por meio de cromatografias estas duas frações somente com as doses de 2,0 e 3,0 kGy, sendo que a dose de 5,0 kGy produziu principalmente agregados, embora a análise eletroforética tenha mostrado a manutenção de parte destes compostos.

Os agregados de 2,0 kGy mostraram-se cerca de 15 vezes menos tóxicos do que o veneno nativo, enquanto as frações não agregadas irradiadas com a mesma dose, cerca de 3,5 vezes. O veneno crotálico irradiado com 2,0 kGy não produziu agregados tão destoxicados quanto aqueles obtidos por NASCIMENTO et al. (1996) ao irradiar a crotoxina pura com a mesma dose (tais compostos apresentaram-se 40 vezes menos tóxicos que a crotoxina nativa). Provavelmente este fato explica-se pela complexidade na composição do veneno crotálico, uma vez que ao serem irradiadas misturas protéicas em solução, os danos sofridos pelas moléculas são menores que ao serem irradiados os componentes em separado, pois as diversas moléculas presentes na mistura desempenham, uma em relação a outra, um papel protetor (SKALKA & ANTONI, 1970).

NASCIMENTO et al. (1996) verificaram a formação de 50% de agregados protéicos com a dose de 2,0 kGy sobre a crotóxina. No presente trabalho, esta mesma dose sobre o veneno crotálico induziu a formação de 51% de agregados. Quando a atividade imunogênica destes agregados foi avaliada, estes mostraram-se bastante eficientes na produção de altos títulos de anticorpos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno nativo. Foi verificado neste trabalho que a capacidade neutralizante dos antiagregados de 2,0 kGy foi idêntica à dos anticorpos antiveneno nativo, demonstrando assim que a atividade imunogênica dos agregados foi preservada.

As avaliações das amostras de veneno irradiadas com 3,0 e 5,0 kGy demonstraram que a quantidade de agregados gerada com estas doses foi respectivamente de 61% e 88%, sendo estes 18 e 45 vezes menos tóxicos que o veneno nativo. Embora estas frações tenham induzido a formação de um alto título de anticorpos, estes não foram eficientes na neutralização da atividade tóxica do veneno nativo. A amostra irradiada com 10,0 kGy, por sua vez, também foi submetida ao procedimento de separação em cromatografia de exclusão molecular, mas não foi possível uma recuperação de quantidades de proteínas suficientes para a realização do ensaio da atividade tóxica e imunogênica.

Os agregados gerados com a dose de 2,0; 3,0 e 5,0 kGy sobre o veneno crotálico apresentaram-se consideravelmente menos tóxicos do que o veneno nativo e esta atenuação foi crescente conforme o aumento da dose, corroborando os resultados de GUARNIERI (1992) e MURATA (1988). Porém a dose de 2,0 kGy, embora tenha produzido menores concentrações de agregados, foi a que gerou agregados mais eficientes em formar anticorpos com capacidade de neutralizar o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, quando comparado às demais doses. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por GUARNIERI (1992) que também estabelece a dose de 2,0 kGy como a mais indicada no tratamento de venenos botrópicos, visando à melhoria do processo de imunização para a obtenção de soros antibotrópicos.

O veneno crotálico que recebeu 2,0 kGy de irradiação apresentou manutenção de sua imunogenicidade, sendo os anticorpos antiveneno total irradiado com 2,0 kGy muito mais eficientes do que os antiveneno nativo (capacidade neutralizante de 100 e 55 DL₅₀ por ml de anti-soro respectivamente), ambos obtidos em coelhos. A mesma eficiência não foi observada pelos agregados solúveis do veneno irradiado com 2,0 kGy, os quais induziram a formação de anticorpos, em camundongos, com mesmo título e potencial neutralizante que o veneno não irradiado. Estes resultados sugerem ser o veneno total irradiado com 2,0 kGy melhor imunógeno na produção de anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar o veneno crotálico do que os agregados gerados com a mesma dose ou o próprio veneno nativo.

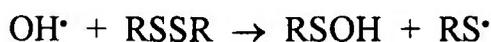
Uma das hipóteses levantadas para explicar tal aumento na imunogenicidade do veneno total irradiado encontra-se no fato de que alguns fatores, tais como via de inóculo, uso de adjuvantes, dose e natureza intrínseca do antígeno, contribuem para a eficiência dos processos de imunização. A forma de um antígeno é um fator extremamente importante em sua imunogenicidade. Antígenos particulados freqüentemente são muito mais imunogênicos do que moléculas solúveis e frações monoméricas solúveis de proteínas que induzem uma fraca resposta, quando são agregadas passam a induzir uma boa resposta de anticorpos. Uma das razões para este efeito é a rápida fagocitose de antígenos particulados, comparados com materiais solúveis, por células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos (HARLOW & LANE, 1988).

Provavelmente as agregações e precipitações protéicas ocorridas após a irradiação do veneno crotálico estejam contribuindo para o notável aumento na resposta imune provocado pela amostra irradiada com 2,0 kGy, quando comparado ao veneno nativo. Corroborando esta hipótese, os resultados obtidos por CARDI (1995) demonstram maior e mais rápida incorporação de toxinas irradiadas em macrófagos peritoneais de camundongos, quando comparadas com a forma nativa. A hipótese

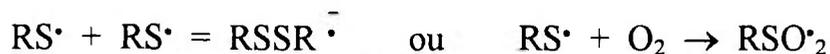
sugerida pelo autor para explicar tal fato é a existência de receptores específicos contra as toxinas irradiadas nas membranas de macrófagos, estudo este em andamento.

Outra hipótese levantada para explicar o aumento da imunogenicidade do veneno irradiado com 2,0 kGy baseia-se na presença de concentrações consideráveis de moléculas protéicas de veneno, que sofreram o processo de irradiação mas não se encontram agregadas ou precipitadas, aqui denominadas de frações não agregadas do veneno irradiado. Estas moléculas podem sofrer alterações estruturais, onde ocorrem rompimentos de ligações moleculares como resultado da ação de radicais livres formados pela radiólise da água (KUME & MATSUDA, 1995), causando assim desnaturações radioinduzidas. Estas desnaturações das toxinas presentes no veneno após a irradiação estariam, como será explicado posteriormente, contribuindo para que as toxinas fossem apresentadas de modo mais eficiente ao sistema imune.

As alterações provocadas pelas espécies reativas da água, entre elas o radical hidroxila (OH^\bullet), elétron aquoso (e^-_{aq}) e o radical hidrogênio (H^\bullet), com os aminoácidos das proteínas, são as mais diversas possíveis. O radical hidroxila, por exemplo, pode reagir com a glicina, causando reações de adição e/ou redução, enquanto o grupamento contendo enxofre da metionina e cistina são geralmente oxidados. No caso da cistina, o radical OH^\bullet pode interagir com a ligação dissulfeto levando a um rompimento desta ligação, de acordo com a equação:



Por outro lado, a cisteína pode sofrer uma abstração do hidrogênio do grupo SH, produzindo primeiramente um radical do tipo RS^\bullet que pode reagir com outro radical RS^\bullet , ou com outros átomos em solução, por exemplo:



O radical RSSR^\cdot , por sua vez, se dissocia muito rapidamente (dentro de 10^{-6} segundos ou menos), sendo bastante instável em uma solução (ASMUS, 1983).

Estes são apenas alguns exemplos de reações que podem ocorrer entre os aminoácidos presentes nas proteínas e as espécies reativas formadas pela radiólise da água. Contudo, o efeito final observado após as irradiações é de alteração na conformação inicial das proteínas; uma soma das alterações a nível terciário, secundário e primário (KUME & MATSUDA, 1995), sendo este efeito final variável de acordo com as condições de irradiação (SKALKA & ANTONI, 1970).

No que diz respeito à estimulação específica do sistema imune por um antígeno protéico, de forma resumida, os linfócitos B com imunoglobulinas específicas na sua superfície externa são selecionados por uma proteína estranha, que é internalizada no linfócito e fragmentada em peptídeos. Alguns destes peptídeos, denominados de epitopos-T, se ligam a moléculas decodificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e são então apresentados na superfície externa do linfócito B. O complexo peptídeo-MHC interage com um receptor (Tcr) localizado na superfície de linfócitos T que são então ativados, tornando os linfócitos B aptos a proliferar e diferenciar em células secretoras de imunoglobulinas específicas no plasma. A proliferação de células T específicas também pode ser realizada por células apresentadoras de antígeno não específicas, como por exemplo os macrófagos e células dendríticas, que também são capazes de apresentar fragmentos de proteínas estranhas em associação à moléculas MHC (MAILLÈRE et al., 1995). É muito provável que proteínas tóxicas sejam capazes de estimular o sistema imune deste modo, porém as toxinas presentes em venenos são compostos extremamente estáveis, resistindo a vários ataques enzimáticos, um estágio considerado crítico na fragmentação e apresentação de antígenos (BOQUET, 1979).

MAILLÈRE et al. (1995) e MAILLÈRE et al. (1993) sugerem que as toxinas necessitem sofrer uma sensibilização prévia para tornarem-se suscetíveis aos ataques

enzimáticos que ocorrem no interior de células apresentadoras de antígeno (CAA). Esta sensibilização envolveria uma redução das pontes dissulfeto das proteínas pelas CAA. Com a redução destas pontes a proteína sofre um desdobramento conformacional, tornando-se capaz de ligar-se diretamente às moléculas MHC classe II e de sofrer o ataque proteolítico.

A radiação portanto poderia estar atuando nestas toxinas de modo a causar desnaturação e desdobramento das moléculas. Uma vez que ocorrem, entre outras reações, reduções de pontes dissulfeto durante a irradiação de proteínas, poderia estar ocorrendo a facilitação da digestão de toxinas pelas enzimas lisossomais em células apresentadoras de antígeno e posterior facilitação na apresentação dos epitopos ao sistema imuológico.

Uma soma das duas hipóteses aqui levantadas poderia justificar o aumento do título de anticorpos observado durante a imunização com o veneno total irradiado com 2,0 kGy, uma vez que nestas amostras encontram-se presentes os precipitados, os agregados solúveis e as frações irradiadas não agregadas.

Os resultados aqui apresentados justificam a utilização da dose de 2,0 kGy de radiação ionizante como método eficaz na atenuação da toxicidade e manutenção da imunogenicidade do veneno crotálico, visando à melhoria dos processos de soroprodução.

A partir da irradiação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nas condições citadas e da avaliação de seus produtos pelas metodologias utilizadas, podemos concluir que:

1) As doses iguais ou superiores à 2,0 kGy causam agregação e precipitação das proteínas em solução.

2) Entre todas as doses de irradiação utilizadas, a quantidade de agregados solúveis produzida foi maior com a de 5,0 kGy. Embora estes compostos apresentem-se 45 vezes menos tóxicos que o veneno nativo, eles não são eficientes na indução da formação de anticorpos capazes de neutralizar a ação tóxica do veneno.

3) Os agregados produzidos com a dose de 2,0 kGy apresentam-se 15 vezes menos tóxicos que o veneno nativo e tão eficientes quanto estes na capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes.

4) As doses de 5,0 e 10,0 kGy promovem atenuação praticamente total da toxicidade do veneno, causando também diminuição considerável de sua capacidade imunogênica.

5) A dose de 2,0 kGy promove atenuação da toxicidade do veneno e manutenção de sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, justificando assim a utilização do **veneno total irradiado com 2,0 kGy** como imunógeno ideal na produção de soro anticrotálico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S.D. ; KAISER, I.I. Toxicity assays. *Toxicon*. v.23, p.11-13, 1985.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. A complete aminoacid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* v.249, p.296-300, 1986.

AIRD, S.D.; YATES, J.R.I.; MARTINO, P.A.; SHABONOWITZ, J.; HUNT, D.F.; KAISER, I.I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1040, p. 217-224, 1990.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R.J.. Giroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a trombin-like enzyme. *Toxicon*, v.26, p.953-960, 1988.

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

ASMUS, K.D. Sulfur-Centered Free Radicals. In: ADAMS, G.E. *Radioprotectors and Anticarcinogens*. Copyright, Academic Press, 1983, p. 23-42.

De acordo com as normas extraídas da NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), adaptadas e exemplificadas para o uso do IPEN.

- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, P. Acidente Crotálico, In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*: São Paulo, Brasil, Sarvier, 1992, p. 161-170.
- BARIDE, M.; JAIN, S.D.; GAITONDE, BB. Biochemical studies on toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian. J. Med. Res.*, v.72, p.571-576, 1980.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos - Revisão. *J.B.M.*, v.65, n.4, p.209-250, 1993.
- BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A.M.; DIAS, W.O.; ESTEVES, M.I.; HIRACHI, E.; OISHI, N.Y.; PICARELLI, Z.P.; ROCHA, M.C.; UEDA, C.M.P.M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A sistematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem. Inst. But.*, v.49, p.69-78, 1987.
- BERNARDES, D.M.L. *Avaliação de métodos de identificação de especiarias e vegetais desidratados submetidos a irradiação gama*. São Paulo:1996. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- BOQUET, P. Immunological propeties of snake venoms. In: LEE, C.Y. *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol.52, Berlim, Spring-Verlag, 1979, p. 751-824.
- 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.*, v.72, p. 248-253, 1976.
- BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* v.24, n.3/4, p.273-282, 1984.

- CARDI, B.A. *Estudo morfofisiológico comparativo da crotoxina nativa e irradiada em tecidos e células de camundongos CBA/J*. São Paulo:1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- CARDOSO, J.L.C. *Acidentes por animais peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos - comentários e sugestões*. Brasília, Nov. 1993 (NR:93-1011).
- CHUANG, P.V.; PERELMAN, N.; TONG, D.; NIMMI, M.E. The effect of gamma irradiation on collagen molecules isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *J. Biomed. Mat. Res.*, v.24: p.581-589, 1990.
- 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*, v.1, p.24-29, 1985.
- 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. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v.20, p713-720, 1987.
- DALE, W.M. *Biochem. J.* v.36, p.80, 1942 apud SKALKA, M.; ANTONI, F. Effect of radiation on the biological properties of proteins. In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.1-11.
- FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S. Soroterapia. In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*: São Paulo, Brasil, Sarvier, 1992, p. 176-181.

- FLOWERS, H.H. The effects of X-irradiation on the biological activity of Cottonmouth Moccasin (*Agkistrodon Piscivorus*) venom. *Toxicon*, v.1, p.131-136, 1963.
- FREIRE-MAIA, N. *Radiogenética Humana*. São Paulo, Edgard Blücher, Editora da USP, 1972.
- GIROUX, E.; LACHMANN, P.J. "In vivo" diminution by chelators of snake venom provoked hemorrhage and "in vitro" inhibition of proteolytic activity. *Toxicon*, v.19, p.481-492, 1981.
- GONÇALVES, J.M.; POLSON, A. The eletrophoretic analysis of snake venoms. *Arch. Biochem.*, v.13, p.253-259, 1947.
- GROSH, D.S.; HOPYWOOD, L.E. *Biological effects of radiation*. New York, N.Y.: Academic Press., 1979.
- 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 (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- GUIDOLIN, R.; DIAS DA SILVA, W.; HIGASHI, H.G. CARICATI, C.P.; LIMA, M.L.S.R.; MORAES, J.F.; PINTO, J.R.; MARCELINO, J.R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópico e crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem. Inst. But.* v.51; p.85-90, 1989.
- HAJOST, G.; DELLINCEÉ, H. Structural investigation of radiation-induced aggregates of ribonuclease. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.44, n.4, p.333-342, 1983.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. USA: Cold-Spring Harbor Laboratory, 1988.

- HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - An Introduction*. New York: Springer-Verlag, 1986.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.34, n.4, p.347-354, 1992.
- KAISER, I.I.; MIDDLEBROOK, J.L.; CRUMRINE, M.H.; STEVENSON, W.W. Cross-reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon*, v.24, p.669-678, 1986.
- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C.Y. *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol.52, Berlim, Springer-Verlag, 1979, p.159-222.
- KOCHOLATY, W.F.; GOETZ, C.J.; ASHLEY, B.D.; BILLINGS, A.T.; LEDFORD, E.B. Immunogenic response of the venoms of Fer de Lance, *Bothrops atrox asper*, and La Cascabella, *Crotalus durissus durissus*, following photooxidative detoxification. *Toxicon*, v.5, p.153-158, 1968.
- KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DALY, J.G. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venom of *Crotalidae*, *Elapidae* and *Viperidae*. *Toxicon*, v.9, p.131-138, 1971.
- KUME, T.; MATSUDA, T. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, v.46, n.2, p.225-231, 1995.
- LATARJET, R. Rads and Grays - Becquerels and Curies. *Radiat. Res.*, v.141, p.105-107, 1995.

- LAUHATIRANANDA, P.; GANTHAVORN, S.; HAYDOM, V. Radiation effects on Cobra venom. In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.107-112.
- LAURE, C.J. Die Primärstruktur des Crotamins. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* v. 356, p.213-5, 1975.
- MAILLÈRE, B.; COTTON, J.; MOURIER, G.; LÉONETTI, M.; LEROY, S.; MÉNEZ, A. Role of Thiols in the Presentation of a Snake Toxin to Murine T Cells. *J. Immunol.*, v.150, p.5270-5280, 1993.
- 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*, v.33; p. 475-482, 1995.
- MEBS, D. Use of Toxins in Neurobiology and Muscle Research. In: STOCKER, K.F. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston: CRC, 1990, p.57-78.
- MEIER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K.F. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston: CRC, 1990, p. 1-32.
- MOROZ, C.; GOLDBLUM, N. & VRIES, A. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboximethyl-cellulose-bound neurotoxin as antigen. *Nature*, v.16, p.697-698, 1963.
- MURATA, Y. *Efeitos da radiação gama no veneno de Crotalus durissus terrificus*. São Paulo: 1988. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

- MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H.G.; DIAS DA SILVA, W.; ROGERO, J.R. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon*, v.28. p.617, 1992.
- NASCIMENTO, N. *Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos*. São Paulo: 1991. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, v. 34, p.123-131, 1996.
- PAULA, R.A. *Obtenção e avaliação de anticorpos induzidos por veneno crotálico ou crotoxina irradiados em fonte de ⁶⁰Co*. São Paulo:1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, v.19, n.6, p. 875-887, 1981.
- RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLENAVE, R.N.U.R. *Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos*. Brasília. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. 1989. 37p.
- ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J.Venom. Anim.Toxins*, v.1, n.1, p.7-10, 1995.
- RUCAVADO, A.; MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J.M. Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.29, n.10, p.1337-1340, 1996.

- SALAFRANCA, E.S. Irradiated Cobra (*Naja naja philippinensis*) Venom. *Int. J. Appl. Rad. Isot.*, v.24, p.60, 1973.
- SANTOS, M.C.; YAMAGUCHI, C.P.; CARICATTI, C.P.; HIGASHI, H.G.; DIAS DA SILVA, W. Immunization of equines with phospholipase A₂ protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Brazilian J. Med. Res.*, v.22, p.509-512, 1989.
- SCHEAFFER, R.C.Jr, RANDALL, H.; RESK, J.; CARLSON, R.W. Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. *Toxicon*, v.26, n.1, p. 67-76, 1988.
- SCHUSSLER, H.; HERGET, A. Oxygen effect in the radiolysis of protein. I. Lactate Dehydrogenase. *Int. Radiat. Biol.*, v.37, n.1, p.71-80, 1980.
- SKALKA, M.; ANTONI, F. Effect of radiation on the biological properties of proteins. In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.1-11.
- SKIENS, W.E.; Sterilizing radiation effects on selected polymers. *Radiat. Phys. Chem.*, v.15, p.47-57, 1980.
- SOERENSEN, B. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos. In: SOERENSEN, B. *Animais peçonhentos - reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos*. Rio de Janeiro/São Paulo, Atheneu, 1990. p.91-107.
- SOUZA FILHO, J.N.; GUARNIERI-CRUZ, M.C.; MURATA, Y. ROGERO, J.R. Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.25, p.103-113, 1992.

- SPENCER, P.J. *Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de Bothrops jararacussu irradiado com ⁶⁰Co*. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- STEPHANO, M.A.; YAMAGUCHI, I.K.; HISAKO, H.G.; SANT'ANNA, O.A. Depletory activity of *Lachesis muta* venom (LMV) on the antibody response to unrelated antigens. In: IV SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, Outubro 06-11, 1996, Recife. *Proceedings...* 1996, p.231.
- STOCKER, K. Snake Venom Proteins Affecting Hemostasis and Fibrinolysis. In: STOCKER, K.F. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston: CRC, 1990a, p.97-160.
- STOCKER, K. Composition of Snake Venoms. In: STOCKER, K.F. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston: CRC, 1990b, p.33-56.
- SUNDARAM, K.; PHILIP, J. BHAT, M.B. Radiation effects on *Naja naja* venom and polyvalent antisera. In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.99-106.
- TEJANSEN, P. & OTTOLENGHI, A. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, v.8, p.225-233, 1970.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake venoms. *J. Formosan Med. Assoc.*, v.71, p.394-400, 1972.
- VITAL-BRAZIL, O. PRADO-FRANCESCHI, J. LAURE, C.J. Repetitive muscle responses induced by crostamine. *Toxicon*, v.17, p. 61- 67, 1979.

- VITAL-BRAZIL, O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Mem. Inst. Butantan*, v.49, n.11, p.7-20, 1987.
- YAMAMOTO, O. *Protein Crosslinking - Biochemical and Molecular Aspects*. Edited by: FRIEDMAN, M. p.509, New York: Plenum Press, 1977, apud KUME, T.; MATSUDA, T. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, v.46, n.2, p.225-231, 1995.
- YANG, C.C. Structure-activity relationships and immunochemical studies on cobrotoxin. In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.63-64.
- WHO, *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*, Geneva: 1981 (Publication No. 58).