



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}\text{Co}$  NA  
PEÇONHA DE *Apis mellifera*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS,  
FARMACOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS**

**HELENA COSTA**

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:  
Dr. José Roberto Rogero

**São Paulo  
2001**

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

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}\text{Co}$  NA  
PEÇONHA DE *Apis mellifera*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS,  
FARMACOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS**

HELENA COSTA



Tese apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências  
na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

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

**São Paulo**

**2001**

*À minha mãe, ao meu pai (in memoriam)  
ao meu irmão e ao Luiz,  
pelo amor, carinho, compreensão e apoio  
em todos os momentos.*

*Ao Luís, pelo amor, paciência e incentivo  
em todas as horas*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Rogero, pela orientação, confiança e apoio durante a realização do presente trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e mais especificamente, ao Grupo de Química de Proteínas deste Instituto, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Centro de Radiofarmácia pelo fornecimento do  $^{99m}\text{Tc}$  e disponibilidade na realização dos estudos de marcação.

À Marycel B. Figols, pela incansável ajuda nos estudos de marcação das peçonhas nativa e irradiada.

À Dra. Emiko Muramoto pela dedicação e oportunas sugestões nos experimentos de biodistribuição.

Ao Carlos Gaia da Silveira e à Elizabeth S.R. Somessari, do Centro de Tecnologia das Radiações, pela irradiação das amostras de peçonha.

A todos os colegas do antigo “grupo de venenos” e especialmente à Malvina e ao Patrick pelo apoio, auxílio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, Vera, Arlete, Carla, Roberto Carlos e Johnny, pela ajuda e pelo valor inestimável desta amizade.

À Maria Valda, Luciana, Paula, Cláudio e Alberto, pela grande ajuda nas etapas experimentais e pela amizade.

A todos os colegas do antigo TBR, pela amizade, apoio e incentivo, e em especial à Daniela, Márcia, Miriam e Andréia, pelo companheirismo e ajuda nas etapas experimentais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos amigos de sempre, Samara e Alexandre pelo e incentivo, em todos os momentos e, em especial, ao Júlio, pelo carinho, pela confiança e profunda amizade que me acompanham desde a infância.

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

# ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE $^{60}\text{Co}$ NA PEÇONHA DE *Apis mellifera*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, FARMACOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

Helena Costa

## RESUMO

As abelhas africanizadas são insetos muito comuns no Brasil e freqüentemente causam acidentes, que levam a reações imunológicas importantes e até mesmo à morte. Sua peçonha é composta por uma mistura complexa de substâncias com efeitos biológicos diversos. A radiação ionizante é capaz de modificar estruturas moleculares de proteínas, afetando suas propriedades biológicas. Ela causa diminuição das atividades enzimáticas e tóxicas e parece ser uma boa ferramenta na destoxificação de peçonhas. O principal objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da radiação gama na peçonha de abelha, abrangendo aspectos bioquímicos, farmacológicos e imunológicos. Amostras da peçonha total de *Apis mellifera* (2 mg/ml) em solução salina, foram irradiadas com 2 kGy em uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ . As peçonhas nativa e irradiada foram submetidas a cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (coluna Tosohaas G2000SW), cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (coluna C-18) com gradiente água/acetonitrila e análise por SDS-PAGE. Para ambas peçonhas foram realizados estudos de espectro de absorção U.V., concentração protéica, atividades hemolítica e fosfolipásica e atividade tóxica ( $\text{DL}_{50}$ ). Os estudos de biodistribuição foram realizados após a marcação das peçonhas nativa e irradiada com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Os resultados mostraram que a radiação gama não causou mudanças na concentração protéica nem na imunogenicidade da peçonha, embora observou-se diferenças no espectro UV e no perfil eletroforético. Isto sugere que podem ter ocorrido alterações estruturais nos compostos da peçonha irradiada. Os perfis de HPLC-RP mostraram que a radiação gama pode ter causado mudanças conformacionais, tais como desdobramento das cadeias laterais das moléculas, alterando a exposição de seus grupos hidrofóbicos. As atividades hemolítica e fosfolipásica da peçonha irradiada foram menores que da peçonha nativa. A radiação gama diminuiu a atividade tóxica da peçonha de abelha, mas não aboliu sua atividade biológica, como a hemólise. Os estudos de biodistribuição mostraram que as peçonhas nativa e irradiada foram rapidamente absorvidas e sugere que elas têm metabolismo hepático e eliminação renal. A peçonha irradiada parece ser eliminada mais rapidamente, o que poderia explicar sua toxicidade reduzida.

# STUDY OF GAMMA RADIATION FROM $^{60}\text{Co}$ EFFECTS ON *Apis mellifera* VENOM: BIOCHEMICAL, PHARMACOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS

Helena Costa

## ABSTRACT

Africanized honeybees are very common insects in Brazil and frequently cause accidents followed by important immunological reactions and even deaths. Their venoms are composed of a complex mixture of substances of general biological actions. Ionizing radiation is able to modify molecular structures affecting the biological properties of proteins. It decreases toxic and enzymatic activities and so, it appears promising as a venom detoxification tool. The main objective of this work was to study the effects of gamma radiation on bee venom, regarding biochemical, pharmacological and immunological aspects. Africanized *Apis mellifera* whole venom (2 mg/ml) in 0.15M NaCl solution was irradiated with 2 kGy in a  $^{60}\text{Co}$  source. Native and irradiated bee venoms were submitted to high performance size exclusion chromatography (Tosohaas G2000SW column), high performance reversed phase chromatography in a C-18 column under water/acetonitrile gradient, SDS-PAGE. For both venoms studies have been carried out in UV absorption spectrum, protein concentration, hemolytic activity, and PLA<sub>2</sub> activity analysis, lethality assay (LD<sub>50</sub>). Biodistribution studies was carried out after labelling native and irradiated bee venom with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . The results showed that gamma radiation did not change the protein concentration nor its immunogenicity, although it could be observed that irradiated bee venom UV spectrum and SDS-PAGE profile presented differences when compared to native bee venom. This suggests that some structural alterations in bee venom components could have occurred after irradiation. HPLC-RP profiles showed that gamma radiation could have caused conformational changes, such as unfolding of molecule chains, changing their hydrophobic groups exposing. The hemolytic and the PLA<sub>2</sub> activities of irradiated bee venom were smaller than the native ones. The gamma radiation diminished the toxicity of bee venom, but did not abolish its bioactivity, like hemolysis. Biodistribution studies showed that native and irradiated bee venom have been rapidly absorbed and suggested that they have hepatic metabolism and renal elimination. The irradiated bee venom seems to be eliminated faster than the native one, which could explain its reduced toxicity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Considerações gerais</i> .....	1
1.2. <i>Características bioquímicas dos componentes da peçonha de <i>Apis mellifera</i> e seus mecanismos de ação</i> .....	4
1.3. <i>Métodos de destoxificação e seus efeitos em sistemas biológicos</i> .....	9
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. MATERIAL .....	16
3.2. MÉTODOS .....	17
3.2.1. Coleta e extração da peçonha de <i>Apis mellifera</i> .....	17
3.2.2. Dosagem de proteínas .....	17
3.2.3. Irradiação .....	18
3.2.4. Espectro de absorção no UV .....	18
3.2.5. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC-SE) .....	18
3.2.6. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP) .....	19
3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo (Tricina-SDS-PAGE) das peçonhas nativa e irradiada .....	19
3.2.8. Determinação da atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> .....	20
3.2.9. Determinação da atividade tóxica .....	21
3.2.10. Imunogenicidade das peçonhas nativa e irradiada .....	21
3.2.10.1. Imunização dos animais Swiss .....	21
3.2.10.2. Imunização de camundongos B6D2f1 com as peçonhas nativa e irradiada .....	22
3.2.10.3. Detecção de anticorpos por meio do ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunoabsorbent assay -ELISA) .....	23
3.2.11. Anafilaxia cutânea .....	24
3.2.12. Estudo da ação hemolítica da peçonha nativa e irradiada em eritrócitos humanos .....	24
3.2.12.1. Preparo da solução de eritrócitos a 10% .....	24
3.2.12.2. Determinação da porcentagem de hemólise das peçonhas nativa e irradiada .....	25
3.2.13. Marcação das peçonhas nativa e irradiada com <sup>99m</sup> Tc .....	25
3.2.14. Biodistribuição das peçonhas nativa e irradiada marcadas com <sup>99m</sup> Tc .....	26
3.2.15. Estudos de eliminação das peçonhas nativa e irradiada marcadas com <sup>99m</sup> Tc .....	27
3.2.16. Estudo das imagens cintilográficas das peçonhas nativa e irradiada marcadas com <sup>99m</sup> Tc .....	27
3.2.17. Estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
4.1 Dosagem protéica das peçonhas nativa e irradiada .....	29
4.2 Espectro de absorção na região UV das peçonhas nativa e irradiada .....	29
4.3. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC-SE) .....	30
4.4. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP) .....	32
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo (Tricina-SDS-PAGE) das peçonhas nativa e irradiada .....	35
4.6. Determinação da atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> para as peçonhas nativa e irradiada .....	36

4.7. Determinação da atividade tóxica das peçonhas nativa e irradiada para camundongos da linhagem Swiss.....	36
4.8. Imunização de camundongos Swiss com as peçonhas nativa e irradiada.....	37
4.9. Determinação da atividade tóxica das peçonhas nativa e irradiada para camundongos da linhagem B6D2f1 .....	39
4.10. Imunização dos animais B6D2f1 com peçonha nativa e irradiada.....	40
4.11. Anafilaxia cutânea .....	41
4.12. Estudo da ação hemolítica da peçonha nativa e irradiada em eritrócitos humanos	43
4.13. Determinação da pureza radioquímica das peçonhas, nativa e irradiada, marcadas com $^{99m}\text{Tc}$ .....	44
4.14 Biodistribuição da peçonha nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$ .....	45
4.15. Estudo das imagens cintilográficas das peçonhas nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$ .....	57
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações gerais

Existe um crescente interesse em estudos relacionados à caracterização química, aos mecanismos de ação, à alergenicidade e à farmacologia dos componentes das peçonhas de insetos da Ordem Hymenoptera, devido à sua grande importância médica, visto que existem muitas pessoas que são sensíveis a tais peçonhas. Dentre estes insetos destacam-se as abelhas do gênero *Apis*, particularmente a espécie *A. mellifera*. Esta espécie é cosmopolita e, no Brasil, apresenta cinco subespécies: abelha europa (*A. mellifera mellifera*), italiana (*A. mellifera ligustica*), abelha do Cáucaso (*A. mellifera caucasica*), africana (*A. mellifera scutellata*) e carnica (*A. mellifera carnica*). A maior parte das *A. mellifera* encontradas no Brasil é produto de cruzamento de subespécies européias e africanas, originando as denominadas “abelhas africanizadas” (Manzoli-Palma & Palma, 1992). Essas abelhas podem formar colônias com até 60.000 operárias. São amplamente disseminadas pelo país, sendo encontradas nos diversos apiários e também na forma selvagem, construindo seus ninhos (constituídos de numerosos favos paralelos) em cavidades de árvores, postes de iluminação e caixas feitas pelo homem.

O homem tem sido vítima constante de ataques das abelhas, que usam sua peçonha a fim de defender suas colônias de intrusos (Richards & Davies, 1984). No ato da ferroada ocorre autotomia do aparelho de ferroar, que fica preso à pele da vítima garantindo, desta forma, que a totalidade da peçonha (1-10 µl) seja injetada (cerca de 90% da peçonha em apenas 20 segundos após a ferroada) apesar da morte do inseto (Castro et al., 1993; Schumacher et al., 1994). Todos os componentes da peçonha agem sinergisticamente, de forma a produzir um efeito final de punição da vítima (agressor da colônia), causando um desconforto físico devido a: a) ação localizada, b) ação humoral, c) ação sistêmica e d) indução celular (imune e pseudo-imune). Este desconforto faz com que

o agressor se afaste e aprenda, porém dependendo da sensibilidade imunológica das vítimas e do número de ferroadas (quantidade de peçonha injetada), pode ocorrer anafilaxia e/ou podem ocorrer certos efeitos patológicos (Costa, 1996).

O número de acidentes fatais devido às ferroadas de Hymenoptera sociais causam de três a quatro vezes mais mortes anualmente que picadas de cobras nos E.U.A., chegando a 40 óbitos por ano, sendo que 70% dos óbitos são causados por problemas respiratórios (Gellert, 1992; Straight & Glenn, 1993). Entretanto o número de pessoas hipersensíveis às ferroadas é muito maior que o número de mortes, variando entre 0,15 a 4% da população americana (Schmidt, 1986). Porém, no Brasil não existem relatos oficiais nas estatísticas de saúde para os acidentes causados por *Apis mellifera* (e demais Hymenoptera sociais).

As reações sistêmicas causadas por ferroadas de abelhas são mediadas por IgE específica para os constituintes imunológicos destas peçonhas. Tais reações são apresentadas por indivíduos sensíveis às peçonhas destes insetos. Os sintomas, que podem surgir numa escala de tempo que varia de minutos a algumas horas após a ferroadada, são os seguintes: urticária, angioedema, broncospasmo, choque anafilático, hipotensão e até mesmo perda de consciência.

Em indivíduos que levam múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas geralmente é detectada hemólise intensa acompanhada por insuficiência renal, causada pela ação da apamina, melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> sobre a membrana eritrocitária. Os indivíduos acometidos por milhares de ferroadas evoluem rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal agudas. Nos casos letais, os indivíduos apresentam necrose tubular aguda com presença de cilindros de hemo e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais. Os músculos esqueléticos apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação. Alguns indivíduos

apresentam lesão subendocárdica com presença de necrose muscular. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento (Barraviera, 1994). Ferreira *et al.* (1995) demonstraram que após a inoculação de peçonha de abelha em ratos, ocorreu lesão necrotizante cardíaca aguda, similar ao infarto humano.

Para o tratamento de emergência às vítimas de ferroadas de abelhas tem se empregado antihistamínicos, corticosteróides, broncodilatadores, vasodilatadores, bicarbonato, manitol, e ventilação mecânica (Müller *et al.*, 1991; Barraviera, 1994). No entanto, mesmo após esse tratamento, tem se observado a morte de pacientes, entre 22 e 71 horas após o ataque, alguns apresentando necrose hepatocelular, necrose tubular aguda, necrose focal subendocardial e coagulação intravascular disseminada (França *et al.*, 1994).

A imunoterapia com peçonha de abelhas é bastante eficiente na prevenção de reações sistêmicas e anafiláticas, desensibilizando os indivíduos alérgicos. Esse método requer que o paciente receba numerosas injeções da peçonha diluída iniciando-se com uma concentração de 0,1 µg, aumentando-se essa concentração com o tempo até 100 µg. A duração do tratamento pode ser de até 20 semanas. (Schmidt, 1986). Tem se procurado explicar seu mecanismo de proteção, porém até o presente momento, restam muitas dúvidas a serem esclarecidas. A indicação da imunoterapia é baseada na anamnese, na idade do paciente e no resultado dos testes diagnósticos. Assim, a imunoterapia é recomendada aos pacientes que estejam freqüentemente expostos às ferroadas de *Apis mellifera* e que apresentam história prévia de reações severas, com sintomas respiratórios e/ou cardiovasculares, do grau I de hipersensibilidade; e/ou testes cutâneos positivos (Schmidt, 1986; Reisman, 1992; Castro *et al.*, 1993; Chi, 1995). Porém, existem alguns casos onde ocorrem efeitos colaterais durante a imunoterapia como: reações no local das injeções, reações sistêmicas, com sintomas gastrintestinais, respiratórios e circulatórios, ou

reações como cansaço, fraqueza e dor de cabeça. A frequência desses efeitos colaterais varia entre 10 a 30% dos casos (Schmidt, 1986; Müller *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1995).

Com base nos dados descritos acima, verifica-se a necessidade de se desenvolver técnicas que reduzam a toxicidade da peçonha de abelhas. A peçonha assim destoxicada poderia ser empregada na imunoterapia, possibilitando, talvez, uma redução na frequência de efeitos colaterais durante o tratamento. Além disso, seria interessante realizar um estudo de biodistribuição, para se entender melhor os efeitos patológicos induzidos pela peçonha de *Apis mellifera*. Este estudo também poderia fornecer informações sobre a difusão da peçonha e a cadeia de efeitos biológicos que se observa nas vítimas de ferroadas de abelhas.

### *1.2. Características bioquímicas dos componentes da peçonha de Apis mellifera e seus mecanismos de ação*

As peçonhas de *Apis mellifera* contém misturas complexas de aminas biogênicas, peptídeos e enzimas, que apresentam atividades farmacológicas e alergênicas (Einarsson & Moberg, 1981).

As principais enzimas presentes na peçonha de abelhas são a hialuronidase, a fosfolipase e a fosfatase ácida. As duas primeiras são capazes de provocar reações imunológicas intensas, sendo consideradas responsáveis pelo início das manifestações alérgicas, induzindo a produção de IgE específica, causando hipersensibilidade em algumas pessoas (Dotimas & Hider, 1987). A fosfatase ácida é também um alérgeno, capaz de liberar histamina de basófilos humanos e induzir formação de pústulas na pele de pessoas sensíveis (Barboni *et al.*, 1987).

De acordo com Shkenderov (1974), a hialuronidase e a fosfolipase A em concentrações variáveis, apresentaram propriedades anafiláticas quando aplicadas em

porcos da Índia. Quando a hialuronidase encontrava-se isolada, não apresentou grande toxicidade, e não provocou ação localizada ou sistêmica. Essa enzima funciona sinergisticamente com os outros componentes da peçonha para aumentar a atividade geral do mesmo, representando de 1 a 2 % do peso seco da peçonha bruta (Banks & Shipolini, 1986). Esse sinergismo pode resultar na manifestação dos efeitos de ruptura que essas enzimas têm sobre as células e tecidos na região vizinha ao local da ferroada (Schmidt & Blum, 1978). Os interstícios entre as células são preenchidos por ácido hialurônico, o qual possui propriedades adesivas, promovendo a união das células. Quando o ácido hialurônico é hidrolisado por essa enzima, o interstício fica mais fluido, facilitando a difusão de outros componentes da peçonha. Por esta razão, a hialuronidase é denominada "fator de difusão" (Dotimas & Hider, 1987).

Existe uma variabilidade para os valores de PM desta enzima (de 30 a 64 KDa), que tem sido atribuída aos diferentes teores de açúcares totais presentes na mesma, (Dimitrov & Natchev, 1977).

A fosfolipase A<sub>2</sub> hidrolisa fosfolípidios presentes nas membranas plasmáticas, formando poros e causando assim, a lise celular (Dotimas & Hider, 1987). É uma glicoproteína com uma única unidade de carboidrato ligada à asparagina-13, sendo este o único sítio de N-glicosilação deste polipeptídeo e possivelmente, o epitopo para IgE de indivíduos alérgicos à peçonha de abelha (Weber et al., 1987). Esta enzima representa cerca de 12% do peso seco da peçonha bruta de abelha, tendo sido caracterizadas três isoformas com PM correspondentes a 16, 18 e 20 Kd, respectivamente (Altmann et al., 1991).

Segundo Habermann (1972), a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) proveniente da peçonha de abelhas é capaz de produzir uma série de efeitos farmacológicos tais como: contração de músculos lisos, diminuição da pressão sanguínea, aumento da permeabilidade capilar,

hemólise e destruição dos mastócitos. Quando injetada em ratos, por via intracerebroventricular, esta enzima produz efeitos comportamentais dose-dependentes como distúrbios motores, convulsões e dificuldade respiratória (Gandolfo **et al.**, 1996). Segundo Ownby **et al.** (1997) a PLA<sub>2</sub>, quando injetada por via intramuscular, causa necrose de células musculares esqueléticas.

A peçonha de abelhas é muito rica em peptídeos tais como: melitina, apamina, o peptídeo degranulador de mastócitos (MCD-“Mast cell degranulating”) e o “cardiopep”.

A melitina é um peptídeo que contém 26 resíduos de aminoácidos com PM de 3.000 Daltons. De acordo com Habermann, (1972), a melitina representa cerca de 50% do peso seco da peçonha de *Apis mellifera*, sendo a principal toxina da mesma. Possui atividade hemolítica e sua molécula apresenta forma cilíndrica, constituída de 2  $\alpha$ -hélices que são anfifílicas e forma tetrâmeros em solução, com o objetivo de proteger as regiões hidrofóbicas da molécula. A melitina tetramérica não é lítica, sendo que neste estado de agregação é que a mesma se encontra armazenada no reservatório de peçonha (Dotimas & Hider, 1987).

Segundo Bradrick **et al.**, (1989), dependendo da concentração e do tecido, a melitina provoca constrição ou dilatação dos vasos sanguíneos e despolarização da musculatura cardíaca, causando também a necrose de células musculares esqueléticas, quando injetada por via intramuscular em camundongos (Ownby **et al.**, 1997). A melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub> agem sinergicamente quando associadas, tornando a enzima muito ativa (Habermann, 1972; Dotimas & Hider, 1987; Quistad **et al.**, 1988, Ownby **et al.** (1997).

A melitina também age como fator de dispersão, facilitando a entrada dos demais componentes da peçonha no sistema circulatório da vítima da ferroada, sendo alguns destes mais tóxicos que a melitina propriamente dita (Habermann, 1972).

Foi sugerido que a imunogenicidade da melitina é consequência de sua ligação à membranas celulares com subsequente formação de oligômeros nas bicamadas lipídicas. Aparentemente este peptídeo se liga à membrana celular de maneira assimétrica, com o segmento exposto funcionando como epitopo de célula B, e o segmento incluso, funcionando como epitopo de célula T (King et al., 1994).

A apamina é um peptídeo formado por 18 resíduos de aminoácidos (PM de aproximadamente 2000 Daltons), possui uma cadeia polipeptídica rígida devido à presença de duas pontes dissulfeto, representando menos de 2% do peso seco da peçonha bruta. A molécula é formada basicamente por  $\alpha$ -hélices. A apamina não é lítica, mas exerce influência sobre as membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico, constituindo-se no menor polipeptídeo neurotóxico conhecido (Habermann, 1972). A injeção de apamina em ratos mostrou que esta afeta especificamente as estruturas motoras e auditivas (Cohen, et al., 1988; Moore et al., 1988).

Semelhante à muitas neurotoxinas de cobras, a apamina se liga com grande afinidade aos canais de  $K^+$  ( $Ca^{+2}$ -dependentes), no tecido nervoso (Dotimas & Hider, 1987). A injeção intracerebrovascular de apamina em ratos produziu sinais de envenenamento, como tremor e ataxia. A administração intraperitoneal deste peptídeo foi similar, incluindo efeitos hemorrágicos nos pulmões dos ratos que pode ser devido a um mecanismo neurogênico (Lallement et al., 1995).

O peptídeo MCD é constituído de 22 resíduos de aminoácidos, que difere da melitina por apresentar ao menos duas pontes dissulfídicas, assemelhando-se neste aspecto (estrutural) à apamina. O peptídeo MCD contém dois arranjos diferentes de basicidade, que podem ser separados por cromatografia de troca iônica. Esse peptídeo difere da melitina no seu modo de ação, pois a melitina é um forte hemolisante e libera serotonina de trombócitos, enquanto que o MCD é inativo em ambos os casos (Habermann, 1972).

Segundo Dotimas & Hider (1987), o peptídeo MCD é capaz de degranular mastócitos, mesmo quando presente em baixas concentrações. Esse peptídeo é considerado o terceiro componente da peçonha de abelhas que provoca a liberação de histamina direta ou indiretamente (Habermann, 1972), correspondendo a cerca de 2% do peso seco da peçonha bruta (Banks & Shipolini, 1986).

Foram descritas propriedades de bloqueador dos canais de  $K^+$  para esse peptídeo, porém, seu mecanismo de ação nos mastócitos ainda é desconhecido. Mousli **et al.** (1991), propuseram que ocorra uma interação direta do MCD com a proteína G. Foi identificado o sítio receptor para o MCD, sendo que uma das proteínas apresentou PM de  $77000 \pm 2000$  Da (Rehm **et al.**, 1988).

O “cardiopep” tem PM de aproximadamente 1840 Da e é um peptídeo não tóxico, estimulante betaadrenérgico de propriedades arrítmicas e que pode causar diminuição do trabalho cardíaco e prevenir colapso cardiovascular generalizado (Vick **et al.**, 1974).

De acordo com Dotimas & Hider (1987), a peçonha de abelhas apresenta outros peptídeos com pouca importância alergênica, bioquímica e farmacológica, tais como: secapina, tertiapina e procamina, que têm sido muito pouco caracterizados. Esses peptídeos não são encontrados em todas as amostras de peçonhas e podem variar muito em quantidade de acordo com a subespécie de *Apis*. A secapina contém 25 resíduos de aminoácidos e uma ponte dissulfídica, apresenta baixa toxicidade para os mamíferos e pode estar presente na peçonha numa quantidade acima de 2% da peçonha total. A tertiapina contém 21 resíduos de aminoácidos e duas pontes dissulfídicas e, como a molécula de secapina, apresenta baixa toxidez em relação aos mamíferos. Seu modo de ação parece estar relacionado com a atividade pré-sináptica. A procamina é um peptídeo que contém histamina incorporada na posição C-terminal (Schmidt, 1986). Esse peptídeo

parece ter propriedades radioprotetoras, podendo agir como um “scavenger” de radical livre (Shipman & Cole, 1967; Peck **et al.**, 1978;).

As principais aminas biogênicas presentes na peçonha de *Apis mellifera* são a histamina, a serotonina, a dopamina e a epinefrina, sendo que as duas primeiras estão relacionadas aos processos que levam à indução da dor. A histamina produz dilatação e aumenta a permeabilidade dos capilares sanguíneos sendo que, em concentrações elevadas, pode causar colapso vascular (Smith **et al.** 1985). Este deve ser seu papel na peçonha, facilitando a penetração de toxinas nos tecidos e sendo capaz de produzir dor em mamíferos (Dotimas & Hider, 1987). A serotonina foi detectada no aparato de peçonha e é secretada com a peçonha. É quase certo que a serotonina, assim como a histamina, também seja um agente difusor da peçonha (Dotimas & Hider, 1987; Owen & Sloley, 1988). A dopamina e a epinefrina são comumente neurotransmissores em insetos, podendo influenciar seu comportamento e sua fisiologia. A presença dessas substâncias está relacionada com a aceleração da distribuição de outras frações da peçonha.

Embora tenha sido detalhada a ação de cada um dos componentes presentes na peçonha, sabe-se que todos eles agem de forma sinérgica quando da ferroada.

### *1.3. Métodos de destoxificação e seus efeitos em sistemas biológicos*

Vários trabalhos tem sido realizados, com as mais diversas toxinas, na tentativa de obter-se peçonhas menos tóxicas, porém que conservem suas características antigênicas e imunogênicas, sendo capazes de induzirem a formação de anticorpos, quando introduzidas em um organismo. Neste sentido, pode-se citar o trabalho de Tejasen & Otolenghi (1970) que submeteram a peçonha da serpente *Agkistrodon piscivorus* à irradiação ultravioleta, obtendo uma redução na toxicidade, sendo as atividades fosfolipásica, proteinásica e fosfodiesterásica inativadas mantendo-se, contudo, a

imunogenicidade. Higashi *et al.* (1989) obtiveram resultados semelhantes utilizando o pré-tratamento de peçonhas botrópicas com inibidores de proteinases.

Tem sido empregados vários outros métodos químicos e físicos com o intuito de destoxificar peçonhas de diferentes espécies de serpentes. Dentre estes métodos pode-se citar o tratamento com agentes quelantes (Goucher & Flowers, 1964; Giroux & Lachmann, 1981; Higashi *et al.*, 1989), formalina (Sawai, 1979; Aung-Khin *et al.*, 1980; Baride *et al.*, 1980), iodo (Heneine *et al.*, 1986, Heneine *et al.*, 1988; Daniel *et al.*, 1987), glutaraldeído (Guidolin *et al.*, 1989), formaldeído (Costa *et al.*, 1985), carboximetil celulose (Moroz *et al.*, 1963), foto-oxidação na presença de azul de metileno (Kocholaty *et al.*, 1968), radiação x (Flowers, 1966) e radiação ionizante. Dentre todas as metodologias empregadas, a radiação ionizante, proveniente de raios gama, tem se mostrado muito eficiente na destoxificação de peçonhas ofídicas, conservando suas características imunogênicas e antigênicas, sem adicionar outras substâncias que poderiam funcionar como imunógenos no processo (Purananda, 1972; Kankonkar *et al.*, 1975; Rogero, 1978; Baride *et al.*, 1980; Souza-Filho, 1988; Guarnieri-Cruz *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1990; Nascimento, 1991; Souza-Filho *et al.*, 1992; Andriani, 1995; Rogero & Nascimento, 1995).

A ionização ocorre quando a energia transferida pela passagem de um fóton ou de uma partícula pela eletrosfera de um átomo, é suficiente para a retirada de um ou mais elétrons das camadas externas do mesmo, resultando assim, na formação de um par de íons, negativo ou positivo (Grosch & Hopwood, 1979). A energia da radiação inicialmente absorvida através dos processos de ionização e excitação, é transferida para outros átomos e moléculas, produzindo espécies reativas como os radicais livres. Um radical livre é um composto que possui um único elétron do orbital desemparelhado. Sua vida é curta e possui uma alta probabilidade de reagir com um elétron de outro composto, através da combinação de seu elétron desemparelhado com um elétron de outro átomo, ou através da

liberação de seu elétron desemparelhado, ou ainda através da captura de um elétron de outro átomo. Estas interações podem formar íons adicionais ou outros radicais livres e a maioria dos danos da radiação às moléculas orgânicas está associada com tais cadeias de interações de radicais livres secundários (Butler *et al.*, 1984).

Assim, resumidamente, temos que a radiação ionizante é formada a partir de transições nucleares e tem como características a alta energia associada, ausência de massa, grande poder de penetração e capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde propaga (Grosch & Hopwood, 1979). As espécies produzidas pela excitação e ionização da água e as reações de espécies com moléculas alvos, são de grande importância biológica, visto que a água é o mais abundante constituinte do material biológico.

A irradiação de proteínas, em solução aquosa, causa alterações nas propriedades químicas e físico-químicas das mesmas. Estas mudanças podem levar à perda de atividade biológica das proteínas, bem como alterações nas propriedades imunológicas destas. Os efeitos causados pela radiação ionizante às proteínas em solução, podem ser decorrentes da ação direta ou indireta da mesma. Denomina-se ação direta quando a macromolécula recebe energia diretamente da radiação e ação indireta, quando a macromolécula recebe energia pela transferência de outra molécula, como os produtos da radiólise da água. Quando se comparam os efeitos diretos e indiretos da radiação, observa-se que os diretos são pouco relevantes frente aos efeitos indiretos (Butler *et al.*, 1984; Garrison, 1987).

A radiólise da água pura ou em soluções diluídas causa a formação de radicais livres e espécies moleculares, que apresentam um alto poder de reação como o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), o elétron aquoso ( $e^- \text{aq}$ ), o íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), o radical hidrogênio ( $\text{H}^\bullet$ ), a

água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e o  $\text{H}_2$ . Estes são denominados de produtos primários da radiólise da água.

Destes produtos, o radical  $\text{OH}^\bullet$  e o  $e^- \text{aq}$  têm maior destaque, pois possuem alto rendimento quando se utiliza a radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  (Butler *et al.*, 1984; Butler *et al.*, 1987; Czapski, 1984). O radical  $\text{OH}^\bullet$  é um poderoso agente oxidante e reage com velocidade diferentes com os aminoácidos, dependendo da natureza e tamanho de sua cadeia lateral. Em aminoácidos alifáticos a oxidação causada pelo radical hidroxil envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono alfa. A abstração de hidrogênio de aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína, por exemplo, pode levar a formação de pontes S-S inter e intracadeias. O radical hidroxil reage também com anéis aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos (Butler *et al.*, 1987).

Os aminoácidos aromáticos e os que contém enxofre são os mais sensíveis à oxidação causada pelos radicais hidroxil gerados por radiação ionizante, embora todos os aminoácidos estejam sujeitos ao ataque por estes radicais.

Os elétrons hidratados ( $e^- \text{aq}$ ) são poderosos agentes redutores e reagem com hidrogênio dos aminoácidos aromáticos da mesma maneira que os radicais hidroxila, promovendo, ainda, a desaminação de aminoácidos como alanina, arginina, glicina, histidina, cisteína e cistina (Butler *et al.*, 1984; Butler *et al.*, 1987; Garrison, 1987).

Os produtos da radiólise da água podem induzir mudanças na estrutura primária das proteínas em solução aquosa, pela destruição de aminoácidos específicos e quebra de cadeias polipeptídicas; nas estrutura secundária e terciária, pela desestabilização de pontes de hidrogênio e dissulfeto; e na estrutura quaternária, pela dissociação de subunidades. Estas mudanças estruturais estão relacionadas com a perda da atividade biológica das proteínas, devido a modificações nas propriedades tóxicas, enzimáticas e

imunológicas (Dertinger & Jung, 1970; Adams **et al.**, 1972a; Adams **et al.**, 1972b; Bisby **et al.**, 1974; Chanderkar **et al.**, 1976; Butler **et al.**, 1987; Garrison, 1987; Guarnieri-Cruz **et al.**, 1990; Nascimento **et al.**, 1996).

O efeito final da irradiação de proteínas é quantitativa e qualitativamente diferente, de acordo com as condições empregadas. São vários os fatores que interferem no efeito final da irradiação: presença de oxigênio, tipo de fonte de radiação, dose e taxa de dose, temperatura de irradiação, tipo de solvente, presença de gases e radiomodificadores, estado físico, concentração, pH, toxicidade, antigenicidade e concentração da amostra. (Puranananda, 1972; Kankonkar **et al.**, 1975).

A irradiação de peçonhas ofídicas e suas frações purificadas, irradiadas na dose de 2000 Gy, numa fonte de  $^{60}\text{Co}$ , mantiveram suas características imunogênicas com redução significativa na toxicidade, tornando possível a utilização desta peçonha destoxicada, na imunização de equinos, causando menos danos aos animais (Murata, **et al.**, 1990; Andriani, 1995; Nascimento **et al.** 1996, Rogero & Nascimento, 1997, Clissa **et al.**, 1999, Boni-Mitake, 1999).

A maioria dos dados disponíveis em literatura a respeito de destoxificação de peçonhas está relacionada às de serpentes, como citado acima. Poucos são os trabalhos de destoxificação de peçonhas de Hymenoptera; dentre estes pode-se citar o de Losano **et al.** (1994) que mostraram que a peçonha de *Apis mellifera* quando tratada com tioredoxina sofre redução acompanhada de perda de atividade, podendo desta forma se destoxificar a peçonha com este composto.

Frente ao exposto acima, considerando-se a relevância médica dos acidentes causados por abelhas, decidiu-se neste trabalho, estudar a peçonha total de *Apis mellifera* tal como ocorre no ato da ferroada. Sabendo-se também que a irradiação é uma ferramenta

muito eficiente na destoxificação de peçonhas de serpentes, decidiu-se neste trabalho, submeter a peçonha total de *Apis mellifera* à radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ .

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo comparar o comportamento da peçonha bruta de *Apis mellifera* submetida aos efeitos da radiação ionizante com a peçonha bruta nativa, tendo como parâmetros suas atividades bioquímicas, farmacológicas e imunológicas. Para tal abordagem serão considerados os seguintes aspectos:

- Perfil cromatográfico e eletroforético da peçonha bruta (irradiada e nativa)
- Alterações nas atividades bioquímicas ocorridas devido à irradiação
- Atividade biológica da peçonha irradiada
- Efeitos da radiação nas atividades imunogênicas e antigênicas
- Biodistribuição da peçonha bruta irradiada em comparação com a nativa

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

Foi utilizada a peçonha de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), fornecida em alto grau de pureza pelos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais, sob responsabilidade dos Profs. Drs. Mário Sérgio Palma e Osmar Malaspina (CEIS-UNESP-Rio Claro).

Os camundongos e ratos utilizados nos experimentos foram procedentes do biotério do Departamento de Bioengenharia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). Foram mantidos em gaiolas com maravalha de pinho, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), recebendo ração comercial e água “ad libitum”. Os procedimentos aos quais os animais foram submetidos estão de acordo com os regulamentos para manipulação de animais preparados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Acrilamida, Bis-acrilamida, Coomassie Brilliant Blue G-250, Tricina, TEMED e Persulfato de sódio, Fosfolipase A<sub>2</sub> e melitina- Sigma Chemical Co.

Acetonitrila – Mallinckrodt -USA

Ácido trifluoro acético TFA – Merck – São Paulo

Padrões de baixo peso molecular- Promega.

Éter etílico – Synth

Coluna para HPLC G2000 SW-TOSO HASS.

Coluna e pré-coluna para HPLC C-18-Waters

Kit MDP (metileno difosfonato) - IPEN.

Éter etílico, cloreto de sódio - Synth

$^{99m}\text{Tc}$  obtido em geradores de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  - IPEN

Água bidestilada, purificada em aparelho Milli-Q plus (Millipore).

Os demais reagentes utilizados foram de qualidade elevada com grau P.A.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Coleta e extração da peçonha de *Apis mellifera***

A peçonha foi obtida através de estimulação elétrica, onde uma tela metálica eletrificada é colocada na entrada do ninho. Quando as abelhas pousam, elas fecham o circuito recebendo uma pequena descarga elétrica e ferream uma película de plástico colocada imediatamente abaixo da tela e depositam a peçonha em uma placa de vidro. Esta placa foi posteriormente raspada e a peçonha armazenada em frascos e conservada em geladeira.

Toda a peçonha utilizada no presente trabalho foi proveniente de um único lote, extraído em um único dia.

A peçonha foi solubilizada em presença de solução salina, ou solvente apropriado, e posteriormente a suspensão foi centrifugada a 12100 g por 15 minutos à 4 °C (centrífuga refrigerada Sorvall RC2B), descartando-se o precipitado e utilizando-se o sobrenadante como peçonha bruta.

### **3.2.2. Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi realizada por meio do método de Lowry modificado, conforme descrito por MILLER (1959) utilizando-se albumina de soro bovino

(BSA) como padrão. A dosagem foi realizada antes e após a irradiação para verificar se ocorria perda no conteúdo protéico por precipitação, decorrente do processo de irradiação.

### **3.2.3. Irradiação**

Amostras da peçonha de *Apis mellifera*, 2 mg/ml em solução de NaCl 0,15 M, foram irradiadas em frascos de vidro, com raios gama procedentes de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  - Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd), utilizando a dose de 2 kGy. A irradiação ocorreu em temperatura ambiente, com uma taxa de dose de 800 Gy/h.

### **3.2.4. Espectro de absorção no UV**

Amostras da peçonha nativa e irradiada, na concentração de 0,5 mg/ml em solução de NaCl 0,15 M, foram analisadas em um espectrofotômetro Ultrospec III- (Pharmacia), em comprimentos de onda que variam de 210 a 350nm. Os espectros de absorção foram registrados automaticamente e as leituras obtidas contra solução de NaCl 0,15M.

### **3.2.5. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC-SE)**

As peçonhas nativa e irradiada foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho, em coluna de filtração em gel TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm), no cromatógrafo Waters 501. O sistema foi previamente equilibrado em fase móvel composta por água-acetonitrila-ácido fosfórico 85% (500:1:1 p/p) pH 2,5. Foram injetados 20  $\mu\text{l}$  de extrato bruto em concentração de 2mg/ml, sendo a eluição efetuada com o mesmo tampão de equilíbrio a um fluxo de 1 ml/min. As proteínas foram

acompanhadas por medidas de absorvância a 220 nm e registradas por meio do uso de um registrador/integrador automático Waters 746.

A melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub> de peçonha de abelhas (Sigma), na concentração de 2 mg/ml, foram utilizadas como padrões, para a calibração da coluna e identificação de compostos. Também foram utilizados na calibração da coluna, BSA (Merck) 66 kDa e crotamina (purificada em nosso laboratório) 4,8 kDa.

### **3.2.6. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP)**

As peçonhas nativa e irradiada (20 µl de extrato bruto em concentração de 2mg/ml) foram submetidas à cromatografia de alto desempenho, sob fase reversa, em coluna µBoundapak C-18 – Waters (3,9 mm x 30 cm), à 25 °C, em cromatógrafo Waters 501. Foi realizado um gradiente linear do solvente A (água MILLI-Q, contendo TFA 0,04%) para o solvente B [acetonitrila/água 60/40 (v/v), contendo TFA 0,04%], em 25 minutos, a um fluxo de 1 ml/min.

A eluição foi monitorada por medidas de absorvância a 220 nm e registradas por meio do uso de um registrador/integrador automático Waters 746.

Foram utilizadas, como padrões, a melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub> de peçonha de abelhas (Sigma), na concentração de 2 mg/ml.

### **3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo (Tricina-SDS-PAGE) das peçonhas nativa e irradiada**

A eletroforese foi realizada segundo método descrito por Schägger & von Jagon, (1987), em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, na presença de 0,1% de SDS.

Foram utilizadas alíquotas de 20 µl de amostra às quais foram acrescentados 20 µl de tampão de amostra, contendo tampão TRIS a 0,1 M, SDS 10% (m/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), 0,2% de azul de bromofenol e glicerol 20% (v/v). Posteriormente, as amostras e os padrões de pesos moleculares foram incubados em água fervente por 5 minutos.

Para a corrida, foram utilizados dois tampões, sendo o tampão para o catodo constituído de TRIS-Tricina (TRIS 0,1 M e tricina 0,1 M), SDS 0,1%, em pH 8,25, e o tampão para o anodo, constituído de Tris-HCl 0,2M, pH 8.9, sendo aplicada 30V do início da corrida até o final do gel de empilhamento e 45V a partir deste até o final da corrida, à temperatura ambiente. A visualização do "fronte" eletroforético foi possível por adição de Azul de bromofenol às amostras e padrões. Após a corrida o gel foi incubado em uma solução metanol 50% e ácido 10% (v/v) durante 30 minutos e posteriormente em uma solução contendo Azul de Coomassie G 0,25% (m/v) em ácido acético 10%. A resolução foi finalizada incubando-se o gel em uma solução de ácido acético 10%.

Os padrões de peso molecular utilizados foram: anidrase carbônica 31,0 kDa, inibidor de tripsina de soja 20,7/19,7 kDa, mioglobina cardíaca eqüina 17,0 kDa, Lisozima 14,4 kDa, fragmento do mioglobina (F2) 6,2 kDa; fragmento do mioglobina (F3) 2,5 kDa.

### **3.2.8. Determinação da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub>**

Foi determinada a atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) nas peçonhas nativa e irradiada, de acordo com o método descrito por Holzer et al. (1996). O método consiste na utilização de 0,1 ml do substrato sintético 4 nitro-3octanoyloxy benzoic acid, concentração final 0,25 mM; 1,0 ml de tampão contendo 100 mM Tris pH 8; 10 mM CaCl<sub>2</sub> 100 mM NaCl e 0,1 ml de peçonha nativa ou irradiada em diferentes concentrações. A mistura foi incubada a 37 °C durante 20 minutos. A reação foi bloqueada por adição de 0,1

ml de Triton X-100 (2,5%) e após 10 minutos, procedeu-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 425 nm. Em todos os ensaios foram utilizados brancos apropriados contra os quais foi lida a diferença na absorvância.

### **3.2.9. Determinação da atividade tóxica**

As atividades tóxicas das peçonhas nativa e irradiada foram avaliadas pela determinação da dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) em camundongos inoculados por via intraperitoneal (i.p.), calculada pelo método de Spearman-Kärber (Who, 1981).

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss e B6D2f1, pesando entre 18-22g, divididos em grupos de 5 animais, que foram inoculados por via intraperitoneal, com 200  $\mu$ l da peçonha nativa ou irradiada, em diferentes doses. As doses foram calculadas à partir da concentração protéica das peçonhas nativa e irradiada, utilizando-se fatores de diluição das peçonhas de 1,5 e 1,25 para os experimentos realizados com camundongos Swiss e B6D2F1, respectivamente. O grupo controle recebeu 200  $\mu$ l de solução NaCl 0,15 M também pela mesma via. As mortes dos animais foram registradas 48 horas após a inoculação.

### **3.2.10. Imunogenicidade das peçonhas nativa e irradiada**

#### **3.2.10.1. Imunização dos animais Swiss**

Dez camundongos Swiss, pesando entre 25-30 g, foram injetados por via subcutânea com dose de 5 mg/kg da peçonha nativa ou irradiada de *Apis mellifera* africanizada em solução, emulsificada em adjuvante de Freund completo, na proporção 1:1, num volume total de 200  $\mu$ l, para o primeiro inóculo. Quinze dias após, a peçonha foi administrada por via i.p., utilizando-se também adjuvante de Freund completo. O sangue dos animais foi coletado do plexo retro-orbital, quinzenalmente, a partir da segunda

semana após o primeiro inóculo, para acompanhar a produção de anticorpos, por meio de ELISA. O processo de imunização seguiu com inóculos semanais com as peçonhas nativa e irradiada emulsificadas em adjuvante de Freund incompleto, via i.p., por 50 dias (com intervalo de quinze dias após o primeiro mês). Foram realizados dois inóculos posteriores, via i.p., com as peçonhas nativa ou irradiada em solução salina. Após 75 dias, os animais foram anestesiados e o sangue retirado por punção cardíaca.

O sangue coletado nas sangrias exploratórias foi centrifugado e os soros obtidos armazenados -20 °C, para estudos posteriores.

#### **3.2.10.2. Imunização de camundongos B6D2f1 com as peçonhas nativa e irradiada**

Foram imunizados quatro grupos de animais, utilizando-se peçonha *Apis mellifera* africanizada nativa e irradiada em solução na dose de 2,25 mg/kg, sendo cada grupo composto por camundongos B6D2f1, pesando entre 25 e 30g. O experimento foi realizado por 75 dias. Para o primeiro inóculo foi injetada, por via subcutânea nos camundongos, a peçonha nativa ou irradiada emulsificada em adjuvante completo de Freund na proporção 1:1 e em hidróxido de alumínio 1mg/animal, num volume total de 200 µl. Vinte e um dias após, foi realizado um inóculo nas mesmas condições do primeiro. O processo de imunização seguiu com 3 inóculos de peçonhas nativa ou irradiada sem adjuvante. O sangue dos animais foi coletado quinzenalmente, via plexo retro-orbital, a partir do 21º dia após o primeiro inóculo, centrifugado e os anticorpos presentes no soro, detectados por ELISA.

### **3.2.10.3. Detecção de anticorpos por meio do ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunoabsorbent assay -ELISA)**

Este experimento foi realizado com o objetivo de detectar, no soro dos camundongos utilizados no processo de imunização, possíveis anticorpos formados contra a peçonha nativa e irradiada. Placas plásticas de microtitulação (Nunc) foram incubadas com HCl 0,1 mM por 24 h, posteriormente lavadas 5 vezes com água destilada e, só então, sensibilizadas com a peçonha nativa 100 µl/poço de uma solução contendo 10 µg/ml da peçonha nativa, dissolvidos em tampão carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 e mantidas em câmara úmida, à 4°C por 12 h. A incubação com HCl aumentou a ligação da peçonha às placas. As placas foram lavadas 4 vezes com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 pH 9,6, posteriormente bloqueadas com leite desnatado 5%, por 1 hora, à 37°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween, e foram aplicados nos poços 100 µl de soro dos camundongos previamente imunizados, em várias diluições, a partir de 1/100, em solução leite desnatado 5% em PBS-Tween. Após a incubação por 60 minutos a 37°C, as placas foram lavadas 4 vezes e a revelação foi iniciada com a adição de 100 µl de soro anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1/1000 em solução de leite desnatado 5% em PBS- Tween 20. Após a incubação por 60 minutos a 37 °C, as placas foram lavadas 4 vezes e adicionou-se 100 µl de solução substrato contendo 0,02% de orto-fenilendiamina; 0,0015% de água oxigenada em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,15 M, pH 5,0. Após 20 minutos à temperatura ambiente e no escuro, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de ácido cítrico 0,2 M. A leitura de cada poço foi feita em leitor automático de microplaca (Dynatech MR 4000), utilizando-se filtro de comprimento de onda 450 nm.

Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata. O soro de animais não imunizados foi utilizado como controle.

### **3.2.11. Anafilaxia cutânea**

Foram utilizados neste experimento, 18 camundongos Swiss machos, divididos em 3 grupos de 6 animais cada. Realizou-se tricotomia dorsal em todos os animais, 24 h antes do ensaio. Todos os animais pertencentes aos 3 grupos foram injetados por via intravenosa (via plexo retro-orbital) com 200 µl do corante Azul de Evans (1% em solução salina). Em seguida, nos animais do grupo 1 injetou-se, por via intradérmica (i.d.) no dorso, 20 µl da peçonha nativa 0,25 mg/ml e 20 µl de salina (utilizada como controle negativo) em 2 sítios distintos. Nos animais do grupo 2 injetou-se a peçonha irradiada e salina, nas mesmas concentrações e condições descritas para a peçonha nativa. Nos animais do grupo 3 injetou-se peçonha irradiada e nativa (20 µl a 0,25 mg/ml) em 2 sítios distintos, sendo a peçonha irradiada injetada alguns segundos antes da nativa, para que não houvesse comprometimento dos resultados. Os animais foram sacrificados 5 minutos após a injeção das soluções, a pele foi cortada e rebatida, para a observação do extravasamento ocorrido em decorrência da alteração da permeabilidade capilar.

### **3.2.12. Estudo da ação hemolítica da peçonha nativa e irradiada em eritrócitos humanos**

#### **3.2.12.1. Preparo da solução de eritrócitos a 10%**

Foi coletado sangue humano tipo 0<sup>+</sup>, sendo a seringa e agulha heparinizadas. O sangue foi posteriormente lavado com NaCl 0,15 M, por 3 vezes, por meio de centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos.

Retirou-se uma alíquota do precipitado obtido, a qual foi diluída a 10% em solução NaCl 0,15 M.

### **3.2.12.2. Determinação da porcentagem de hemólise das peçonhas nativa e irradiada**

Incubou-se à 37 °C por uma hora, 0,25 ml da suspensão de eritrócitos a 10% em presença de alíquotas de 0,1 ml da peçonha nativa ou irradiada em diferentes concentrações e 5 ml de solução NaCl 0,15 M. Em todos os ensaios foram utilizados dois tipos de controles: um correspondente ao controle negativo, onde utilizou-se apenas solução NaCl 0,15M e a suspensão de eritrócitos, nas mesmas condições descritas para as amostras e outro correspondente a 100% de hemólise, onde utilizou-se, água Mili-Q e a suspensão de eritrócitos a 10% nas mesmas condições descritas para as amostras e o controle negativo. As absorvâncias, resultantes da liberação de hemoglobina, foram lidas a 545 nm.

### **3.2.13. Marcação das peçonhas nativa e irradiada com $^{99m}\text{Tc}$**

Foram misturados 20 µl do kit MDP (metileno difosfonato), contendo SnCl<sub>2</sub>, previamente diluído com 5 ml de solução de NaCl 0,15 M; 1,5 mCi  $^{99m}\text{Tc}$  (na forma de pertecnetato de sódio) e 0,125 ml de peçonha de *Apis mellifera* nativa ou irradiada, na concentração de 2 mg/ml. Deixou-se reagir por 30 minutos.

Para se determinar a pureza radioquímica do marcado, inicialmente, foi empregada cromatografia de camada delgada, utilizando-se fitas de papel Whatman 3MM e fitas de alumínio impregnadas com sílica gel. As amostras de peçonha nativa ou irradiada foram aplicadas, utilizando-se tubo capilar, a 1,5 cm da origem (margem inferior) da fita. Em seguida as fitas foram colocadas em presença de acetona e solução fisiológica utilizadas como fases móveis. A frente de cada fase móvel percorreu 10 cm a partir do ponto de aplicação da amostra nas fitas. Em seguida as fitas foram secas em estufa e

cortadas em tiras de 1 cm, as quais foram acondicionadas em tubos e sua radioatividade avaliada em contador gama.

A pureza radioquímica do complexo também foi determinada por cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC), em coluna TOSO HASS G2000 SW. O sistema foi previamente equilibrado em fase móvel composta por água-acetonitrila-ácido fosfórico 85% (500:1:1 p/p), conforme descrito por Räder *et al.* (1987). Foram injetados 20 µl das peçonhas nativa ou irradiada marcada, sendo a eluição efetuada com a mesma fase móvel, a um fluxo de 1 ml/min. As frações eluídas foram coletadas a cada minuto e a radioatividade avaliada em contador gama. O perfil protéico foi monitorado a 220 nm.

#### 3.2.14. Biodistribuição das peçonhas nativa e irradiada marcadas com

<sup>99m</sup>Tc

Foram utilizados 60 camundongos, Swiss, pesando  $32 \pm 3$  g (para peçonha nativa) e  $35 \pm 2$  g (para peçonha irradiada), divididos em 10 grupos de 6 animais cada. Estes animais receberam, por via intraperitoneal, 0,1 ml da solução de peçonha (nativa ou irradiada) marcada com <sup>99m</sup>Tc, com atividade de 89 µCi. Após intervalos de 3, 5, 60, 120, 180, 240, 480, 720 e 1440 minutos, os animais foram anestesiados com éter para a retirada de sangue do plexo orbital. Imediatamente após foram retirados o cérebro, coração, pulmões, fígado, baço, rins, estômago, tireóide e músculo esquelético e uma amostra de osso. Os órgãos foram acondicionados em tubos de polipropileno e a radioatividade determinada em contador gama (Cobra II Packard Instruments Ltd).

Para determinação das concentrações sanguíneas utilizou-se as medidas de radioatividade detectadas nas amostras sanguíneas e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$Cs = (M/ms) \times ds$$

$C_s$  é a concentração sanguínea

$M$  é a medida da radioatividade em cpm

$m_s$  é a massa da amostra sanguínea

$d_s$  é a densidade do sangue de camundongos (Altman & Dittner, 1960)

Os cálculos da porcentagem de dose, detectada nos diferentes órgãos, foram efetuados utilizando a radioatividade da dose injetada como padrão.

### **3.2.15. Estudos de eliminação das peçonhas nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$**

Foram utilizados grupos de 6 camundongos Swiss machos, pesando  $28 \pm 3$  g para cada peçonha. Após a administração i.p. das peçonha nativa ou irradiada, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais e suas excretas (urina e fezes) coletadas em intervalos de tempo de 4, 8 e 24 horas. A radioatividade foi contada em contador gama (Cobra II Packard Instruments Ltd).

Os cálculos da porcentagem de dose, tanto para urina, quanto para fezes, foram efetuados utilizando a radioatividade da dose injetada como padrão.

### **3.2.16. Estudo das imagens cintilográficas das peçonhas nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$**

Foram utilizados 3 ratos Wistar, pesando  $250 \pm 10$  g, para a peçonha nativa marcada e 3 para a peçonha irradiada marcada. Os animais foram anestesiados com éter e receberam, via intravenosa, 0,2 ml de peçonha marcada com atividade de 500  $\mu\text{Ci}$ . As imagens foram obtidas em gama câmara, após intervalos de 0,5, 1, 4 e 24 h. Antes de se posicionar os animais na câmara, comprimiu-se a região da bexiga urinária, a fim de que a urina fosse totalmente eliminada e em seguida, os ratos foram anestesiados com éter. Para

os tempos 30 min., 60 min, e 4 h, as imagens foram geradas para 200.000 contagens e para o tempo de 24 h, para 50.000 contagens.

### **3.2.17. Estatística**

Os dados referentes à concentração protéica e atividade fosfolipásica foram analisados pelo teste t de Student.

As curvas de concentrações sanguíneas das peçonhas nativa e irradiada, referentes ao estudo de biodistribuição foram ajustadas pelo método de regressão linear, baseado no algoritmo de Levenberg-Marquardt, disponível no programa computacional Microcal Origin versão 5.0.

O nível de significância adotado foi de 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dosagem protéica das peçonhas nativa e irradiada

O conteúdo protéico das amostras de peçonha foi estimado antes e após a irradiação. As dosagens foram  $2,10 \pm 0,04$  mg/ml para a peçonha nativa e  $2,12 \pm 0,02$  mg/ml, para a peçonha irradiada. Foi aplicado o teste “t” de Student, para n de 5 amostras, sendo que as médias não foram significativamente diferentes, ao nível de 0,05.

### 4.2 Espectro de absorção na região UV das peçonhas nativa e irradiada

As curvas de absorção no UV para as peçonhas nativa e irradiada estão representadas na Figura 1. Pode-se notar, que a peçonha irradiada teve uma maior absorção em todos os comprimentos de onda.

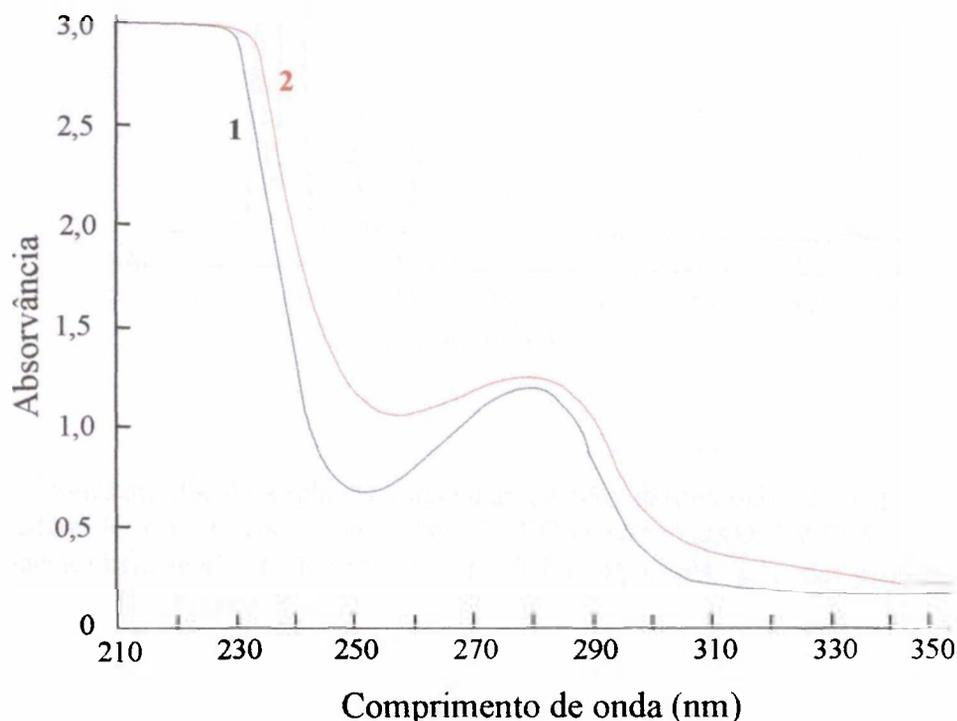


Figura 1. Curvas de absorvâncias das peçonhas nativa (1) e irradiada (2), na concentração de 0,5 mg/ml em solução salina.

### 4.3. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC-SE)

As peçonhas nativa e irradiada foram submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho (HPLC-SE). O perfil obtido para a peçonha nativa está representado na Figura 2 e para a peçonha irradiada está na Figura 3.

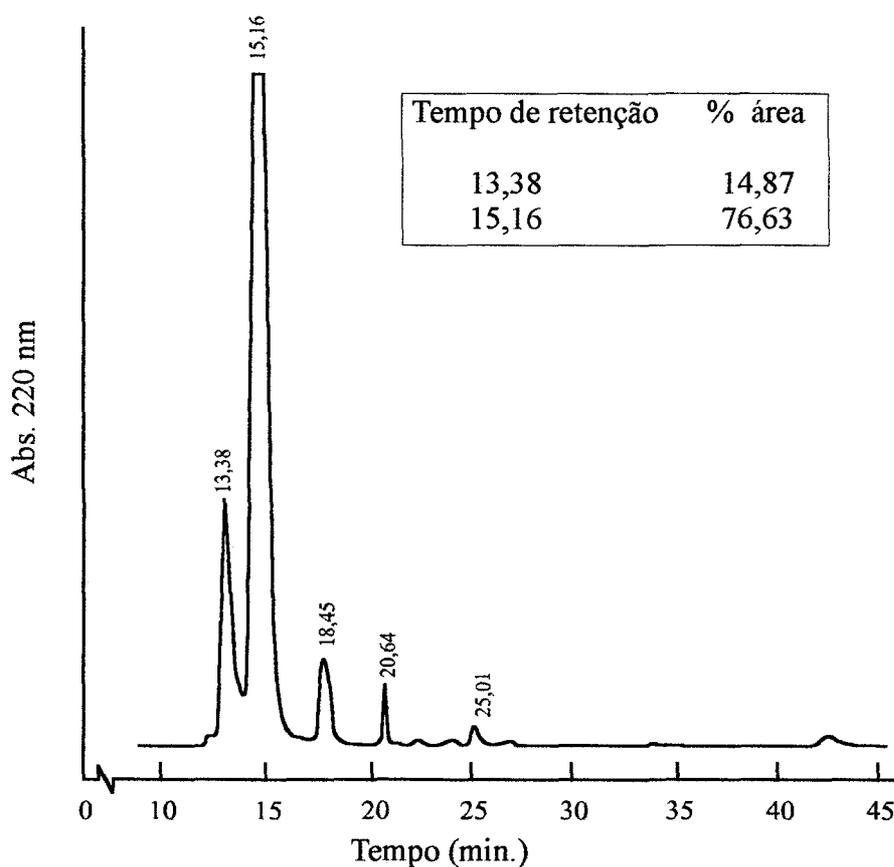


Figura 2: Cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho do extrato bruto da peçonha nativa de *Apis mellifera*, em coluna TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm), em água-acetonitrila-ácido fosfórico 85% (500:1:1 p/p), pH 2,5. As proteínas foram monitoradas pela absorvância a 220 nm.

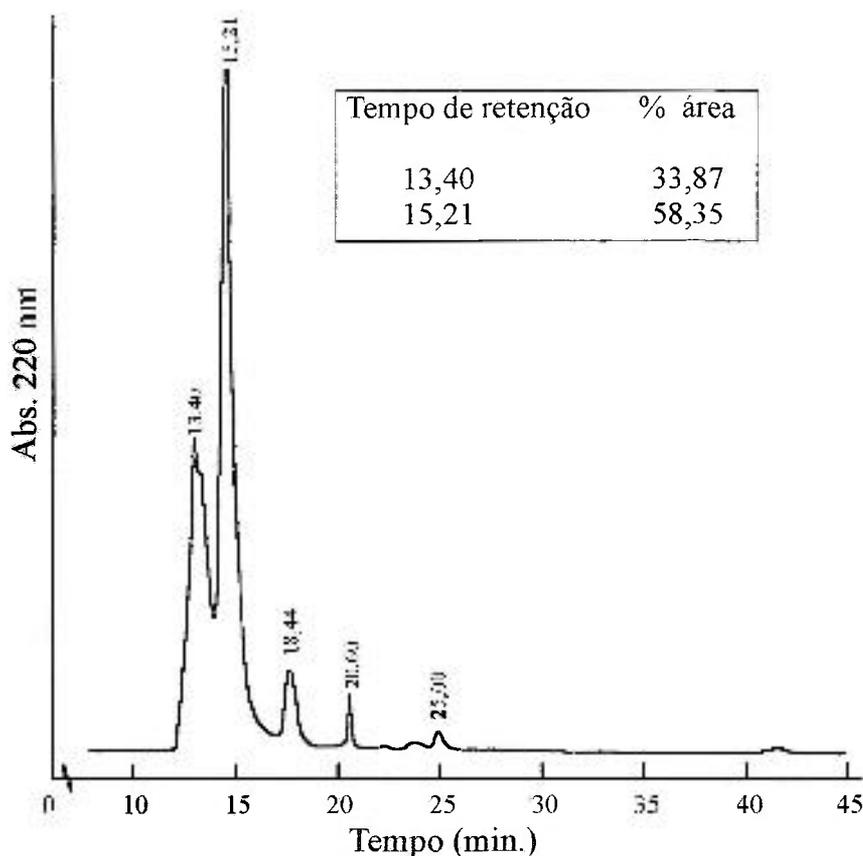


Figura 3: Cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho da peçonha de *Apis mellifera* irradiada, em coluna TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm), em água-acetonitrila-ácido fosfórico 85% (500:1:1 p/p), pH 2,5. As proteínas foram monitoradas pela absorvância a 220 nm.

Pode-se notar pequenas diferenças no perfil cromatográfico da peçonha irradiada, principalmente nos picos correspondentes aos tempos de retenção de 13,40 e 15,21 minutos.

Para a identificação de dois dos principais compostos da peçonha de abelha, a fosfolipase A<sub>2</sub> e a melitina, foram utilizados padrões comerciais (Sigma). Os perfis estão representados nas Figuras 4(A) e 4 (B) respectivamente.

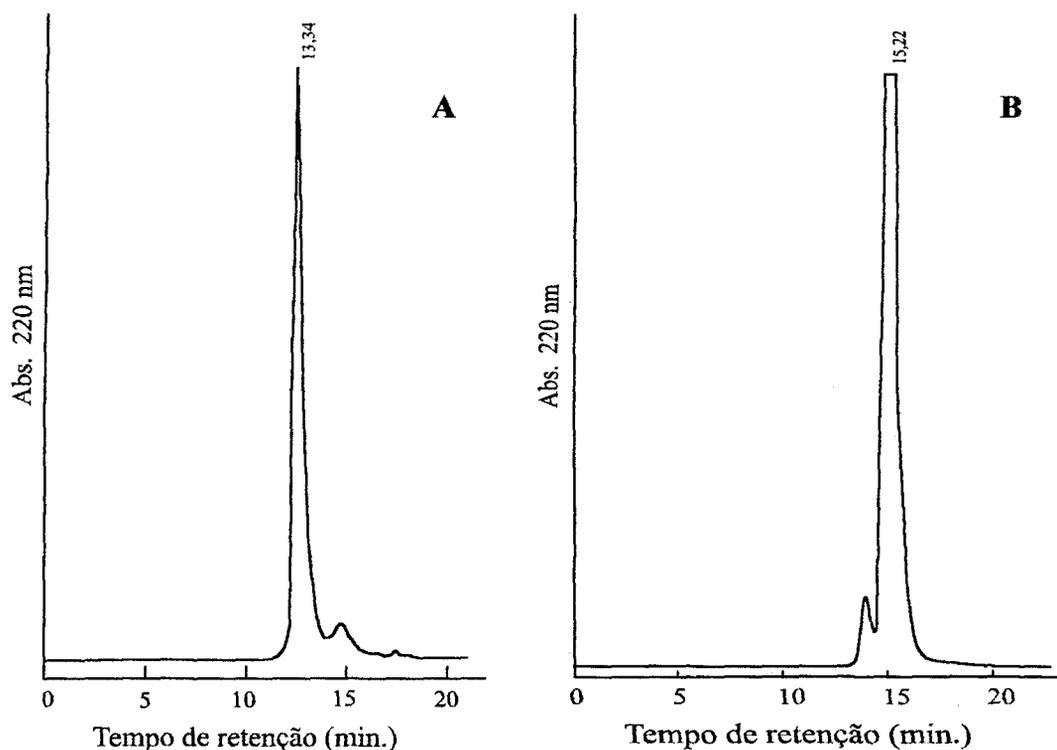


Figura 4. Cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho da PLA<sub>2</sub> (A) e melitina (B) em coluna TOSO HAAS G2000 SW (7,5 mm x 60 cm), em água-acetonitrila-ácido fosfórico 85% (500:1:1 p/p), pH 2,5. As proteínas foram monitoradas pela absorvância a 220 nm.

#### 4.4. Cromatografia líquida de alto desempenho sob fase reversa (HPLC-RP)

Os perfis cromatográficos das peçonhas nativa e irradiada estão representados nas Figuras 5 (A) e 5 (B), respectivamente. Observa-se a presença de vários picos em ambos os perfis e algumas alterações no perfil geral da peçonha irradiada, principalmente para os compostos eluídos de 18,56 a 29,79 minutos. As alterações podem ser evidenciadas, observando-se as diferenças nas porcentagens das áreas dos picos eluídos para as peçonhas nativa e irradiada, neste intervalo de tempo. Os picos correspondente aos tempos de retenção 24,14 e 29,58 / 29,79 min. contém PLA<sub>2</sub> e melitina, respectivamente, como mostrado nas Figuras 6 (A) e 6 (B), que representam os perfis obtidos para os padrões comerciais (Sigma).

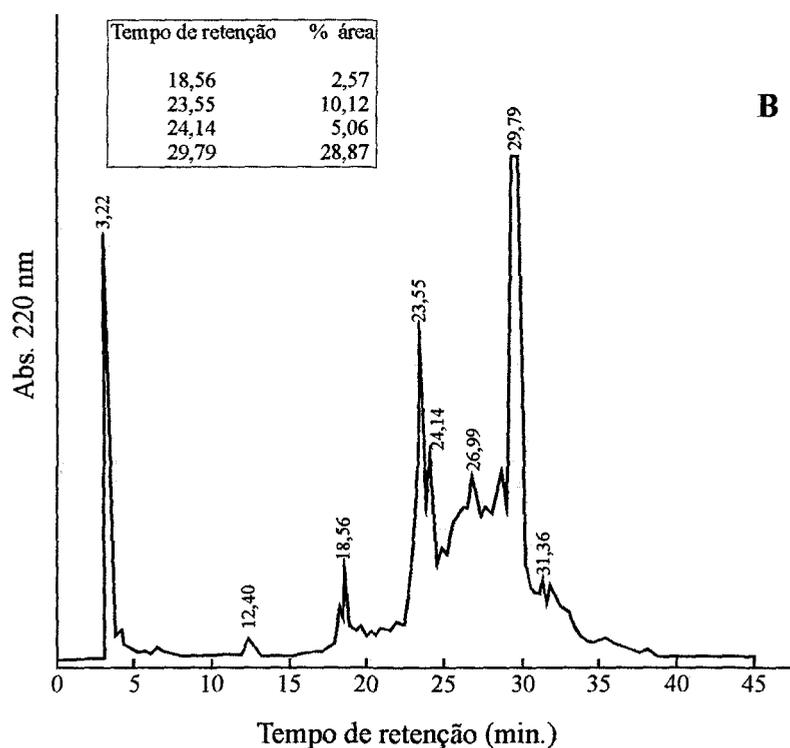
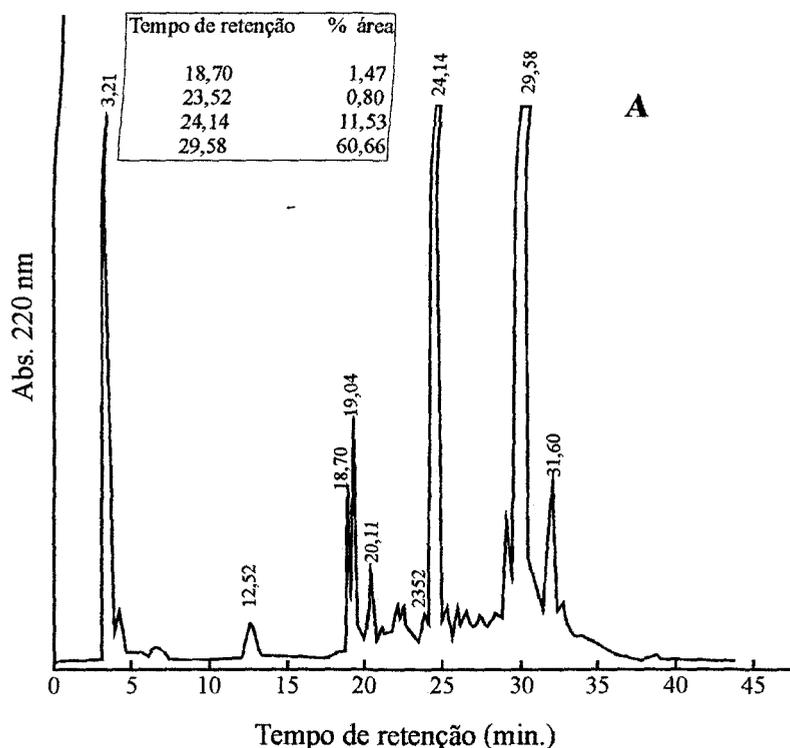


Figura 5: Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa do extrato bruto da peçonha de *Apis mellifera* em coluna  $\mu$ Boundapak (3,9 mm x 30 cm) à 25 °C, utilizando-se um gradiente linear de solvente A (0,04%-ácido trifluoroacético) para o solvente B [acetonitrila/água 60/40 (v/v)], em 25 minutos. Taxa de fluxo de 1 ml/min. As proteínas foram monitoradas pela absorvância a 220 nm. Em (A) tem-se peçonha nativa e em (B) peçonha irradiada.

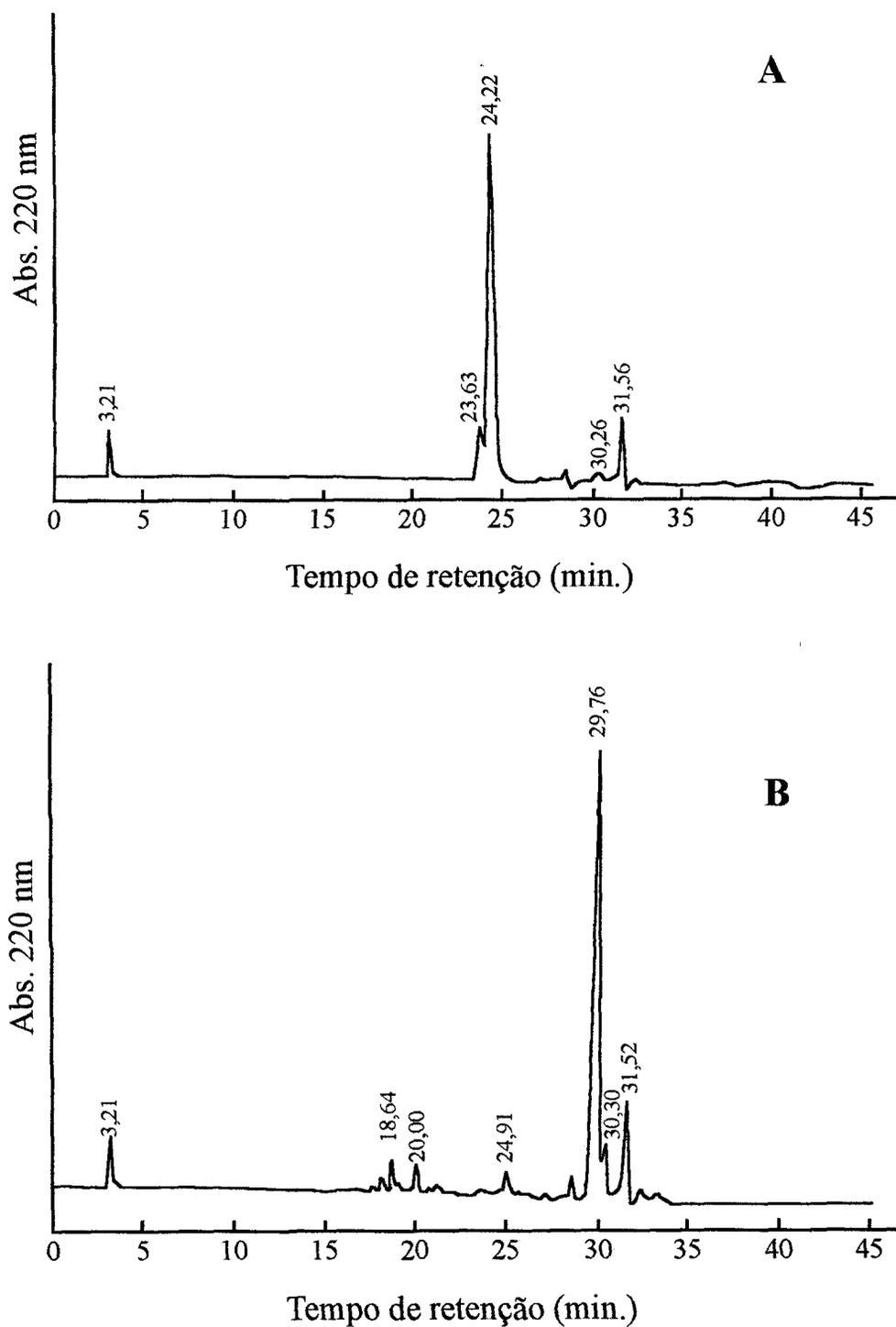


Figura 6: Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa da PLA<sub>2</sub> (A) e da melitina (B), em coluna  $\mu$ Boundapak (3,9 mm x 30 cm) à 25 °C, utilizando-se um gradiente linear de solvente A (0,04%-ácido trifluoroacético) para o solvente B [acetonitrila/água 60/40 (v/v)], em 25 minutos. Taxa de fluxo de 1 ml/min. As proteínas foram monitoradas pela absorvância a 220 nm.

#### 4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo (Tricina-SDS-PAGE) das peçonhas nativa e irradiada

O perfil eletroforético para a peçonha irradiada apresentou algumas alterações em relação ao da peçonha nativa, como o aparecimento de uma banda na região de PM de 18 kDa, que pode ser verificado na Figura 7.

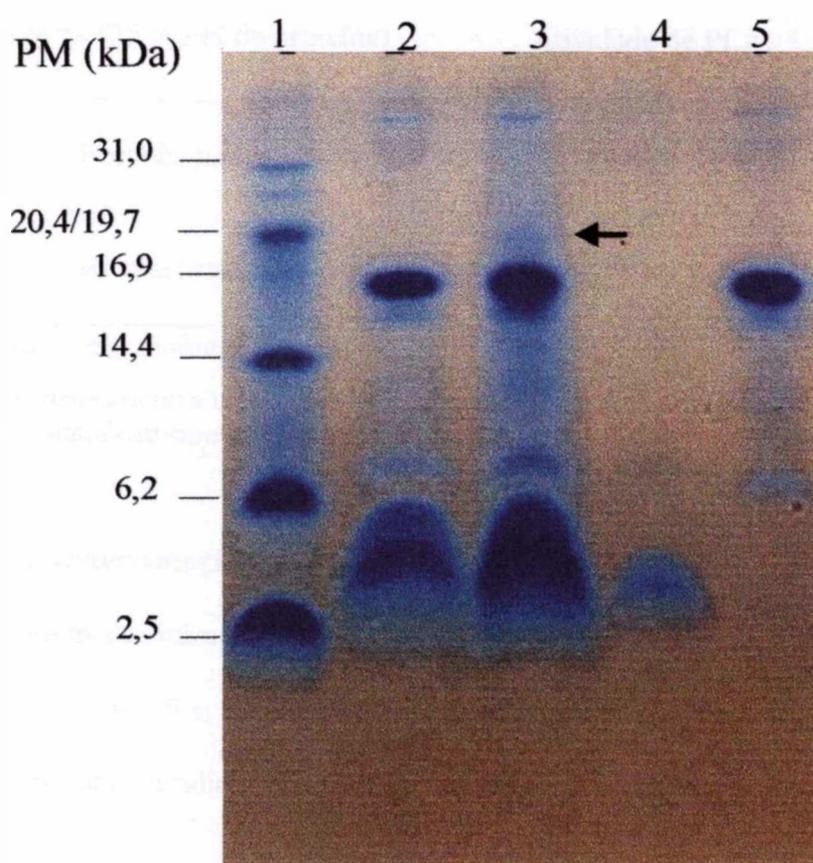


Figura 7. Perfil eletroforético das peçonhas nativa e irradiada. 1: padrões de peso molecular (anidrase carbônica 31 kDa; inibidor de tripsina de soja 20,7/19,7 kDa; mioglobina cardíaca equina 16,9 kDa, lisozima 14,4 kDa; fragmento de mioglobina (F2) 6,2 kDa; fragmento mioglobina (F3) 2,5 kDa); 2: peçonha nativa; 3: peçonha irradiada; 4: melitina e 5: fosfolipase A<sub>2</sub>.

#### 4.6. Determinação da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> para as peçonhas nativa e irradiada

Os resultados mostraram que a atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha irradiada foi menor que apresentada pela peçonha nativa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> das peçonhas nativa e irradiada

Amostras (25 µg/ml de proteína)	Atividade de PLA <sub>2</sub> *
Peçonha nativa	33,97 ± 1,99
Peçonha irradiada	21,91 ± 0,79

\* (nmoles de produto/min/mg de proteína)

Os valores representam a média para n de 12 amostras; teste t de Student, as médias são significativamente diferentes, ao nível de 0,05.

#### 4.7. Determinação da atividade tóxica das peçonhas nativa e irradiada para camundongos da linhagem Swiss

O valor da DL<sub>50</sub> (dose letal 50%) obtido para a peçonha nativa foi de 5,97 mg/kg e para a peçonha irradiada foi de 13,44 mg/kg, como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Letalidade das peçonhas de *Apis mellifera* africanizada nativa e irradiada, injetada em camundongos Swiss por via intraperitoneal.

Nativa			Irradiada	
Dose (mg/Kg)	% de Mortalidade	DL <sub>50</sub> mg/Kg	% de Mortalidade	DL <sub>50</sub> mg/Kg
1,84	0		0	
2,76	0		0	
4,14	20		0	
6,21	80	5,97(4,19 - 8,41)	0	13,44 (10,10-17,91)
9,30	80		20	
14,01	80		40	
21,00	100		100	

DL<sub>50</sub> calculada pelo método de Spearman-Kärber; n= 5 animais /grupo

#### 4.8. Imunização de camundongos Swiss com as peçonhas nativa e irradiada

Os resultados mostraram que todos os animais imunizados responderam tanto à peçonha nativa quanto à irradiada. A figura 8 representa a média das absorvâncias detectadas por ELISA dos anti-soros na diluição de 1:100 de cada grupo, no decorrer da imunização. Os grupos apresentaram uma grande heterogeneidade nas respostas durante todo o protocolo imunização. Observa-se que os anti-soros dos animais dos grupos 1 (imunizados com peçonha irradiada e Freund completo) apresentaram maiores absorvâncias no ELISA, tendo absorvâncias detectáveis até a diluição de 1:6400, na última sangria (Figura 9). Os animais do grupo 2 (imunizados com peçonha nativa e Freund completo) apresentaram valores de absorvância menores durante o protocolo, tendo absorvâncias detectáveis até 1:3200 (Figura 9).

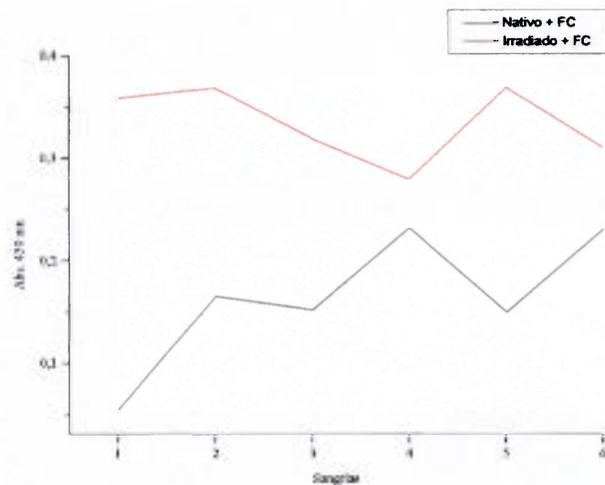


Figura 8. Perfil da resposta dos camundongos Swiss imunizados com peçonha nativa e irradiada no decorrer da imunização. As absorvâncias dos anti soros na diluição 1/100, foram detectadas por ELISA. Estão indicadas as médias das absorvâncias a 450 nm dos animais utilizados em cada grupo experimental. FC: Adjuvante de Freund completo.

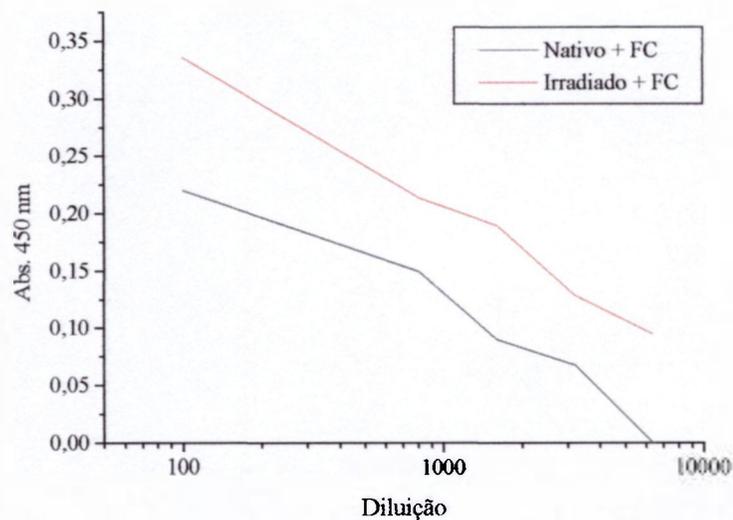


Figura 9. Perfil da resposta dos camundongos Swiss imunizados com peçonha nativa e irradiada. As absorvâncias dos soros da última sangria, em diferentes diluições, foram detectadas por ELISA. Estão indicadas as médias das absorvâncias a 450 nm dos animais utilizados em cada grupo experimental. FC - adjuvante de Freund completo.

#### 4.9. Determinação da atividade tóxica das peçonhas nativa e irradiada para camundongos da linhagem B6D2f1

Devido à grande variabilidade de resposta observada nos experimentos de imunização com camundongos Swiss, optou-se pela utilização da linhagem B6D2f1, que é geneticamente mais homogênea e quando imunizada pode gerar uma resposta mais eficiente (Vaz et al. 1970 a, b, 1974). Para isso, foi necessário, primeiramente, determinar a DL<sub>50</sub> (dose letal 50%) para as peçonhas nativa e irradiada nesta linhagem de camundongos, sendo o valor da DL<sub>50</sub> obtido para a peçonha nativa foi de 2,25 mg/kg e para a peçonha irradiada foi de 7,12 mg/kg, como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Letalidade das peçonhas de *Apis mellifera* africanizada nativa e irradiada, injetada em camundongos B6D2f1 por via intraperitoneal.

Nativa			Irradiada	
Dose (mg/Kg)	% de Mortalidade	DL <sub>50</sub> mg/Kg	% de Mortalidade	DL <sub>50</sub> mg/Kg
2,86	0		0	
3,58	60		0	
4,48	100		40	
5,60	100	2,25 (1,93-2,61)	80	7,12 (5,77-8,77)
7,00	100		80	
8,75	100		80	
10,93	100		80	
13,66	100		60	
17,07	100		100	

DL<sub>50</sub> calculada pelo método de Spearman-Kärber; n= 5 animais /grupo

#### 4.10. Imunização dos animais B6D2f1 com peçonha nativa e irradiada

A Figura 10 representa a média das absorvâncias detectadas por ELISA dos anti-soros diluídos 1:1000 de cada grupo, no decorrer da imunização. Observa-se que os anti-soros dos animais dos grupos 1 (imunizados com peçonha irradiada e Freund completo) e 3 (peçonha nativa e Freund completo) apresentaram maiores absorvâncias no ELISA, tendo absorvâncias detectáveis até a diluição de 1:10000, na última sangria (Figura 11). Os animais do grupo 2 (imunizados com peçonha irradiada e hidróxido de alumínio) e 4 (imunizados com peçonha nativa e hidróxido de alumínio) apresentaram valores de absorvância menores durante o protocolo, tendo absorvâncias detectáveis até 1:5000 (Figura 11). Os dados mostram que os anticorpos produzidos quando se imunizou os animais com peçonha nativa e irradiada em adjuvante de Freund completo, apresentaram título maior que os demais.

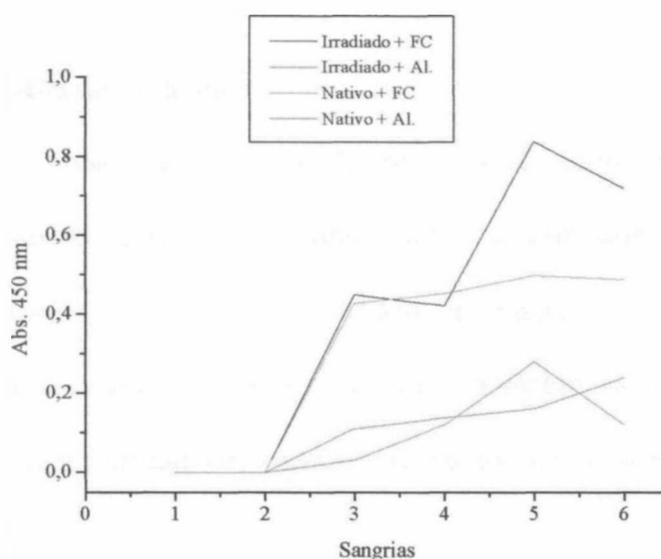


Figura 10. Perfil da resposta dos camundongos B6D2f1 imunizados com peçonha nativa e irradiada, no decorrer da imunização. As absorvâncias dos soros na diluição 1:1000 foram detectadas por ELISA. Estão indicadas as médias das absorvâncias a 450 nm dos animais utilizados em cada grupo experimental. FC - adjuvante de Freund completo; AL - Hidróxido de alumínio.

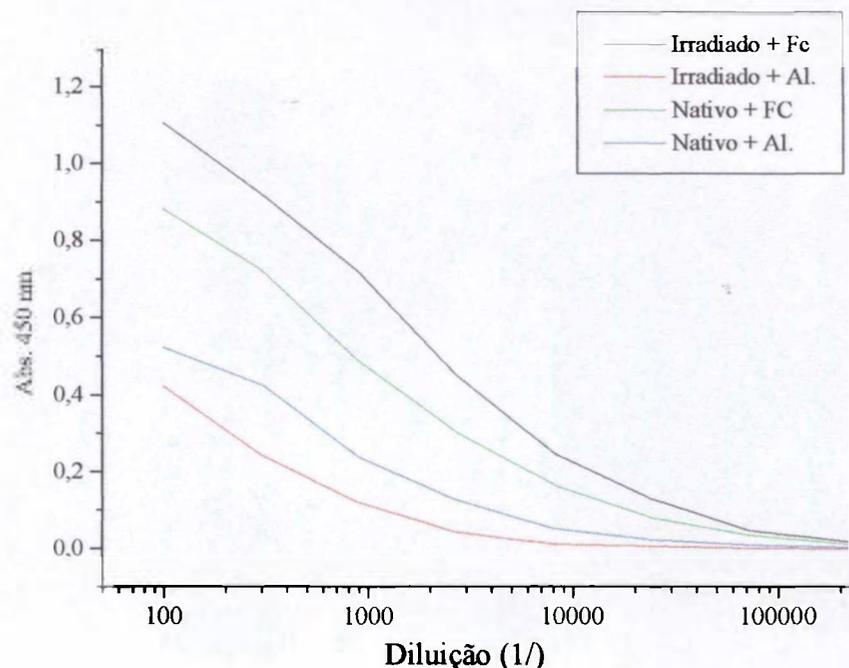


Figura 11. Perfil da resposta dos camundongos B6D2f1 imunizados com peçonha nativa e irradiada. As absorvâncias dos soros da última sangria, em diferentes diluições, foram detectadas por ELISA. Estão indicadas as médias das absorvâncias a 450 nm dos animais utilizados em cada grupo experimental. FC - adjuvante de Freund completo; Al. - Hidróxido de alumínio.

#### 4.11. Anafilaxia cutânea

A administração intradérmica de peçonha de *Apis mellifera*, causa um extravasamento devido ao aumento da permeabilidade capilar, que pode ser visualizado através da administração intravenosa do corante azul de Evans, como demonstrado no teste de anafilaxia cutânea aqui descrito. Observa-se que o aumento da permeabilidade capilar desencadeado pela administração de peçonha nativa foi maior que o ocasionado pela peçonha irradiada. (Figuras 12 a 14).

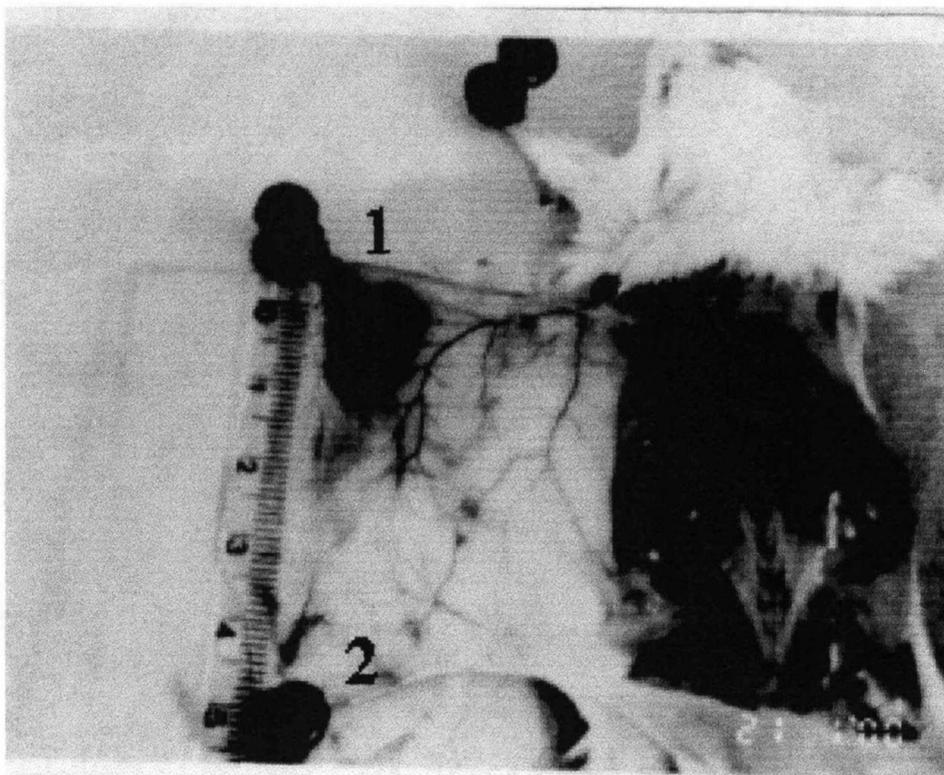


Figura 12. Teste de anafilaxia cutânea utilizando peçonha nativa (1). Como controle, foi utilizada solução salina (2).

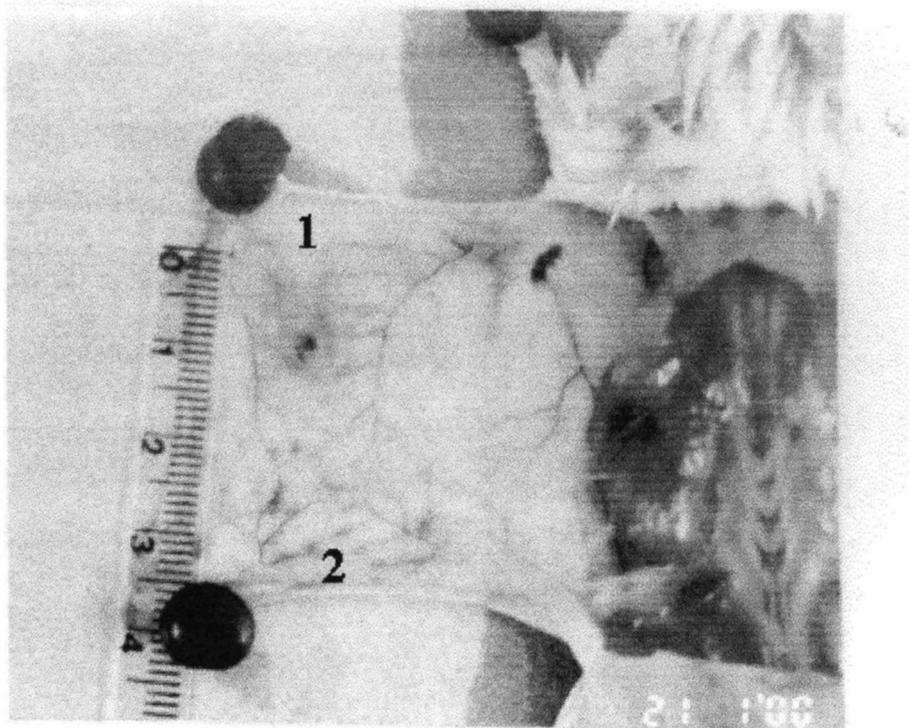


Figura 13. Teste de anafilaxia cutânea utilizando peçonha irradiada (1). Como controle, foi utilizada solução salina (2).

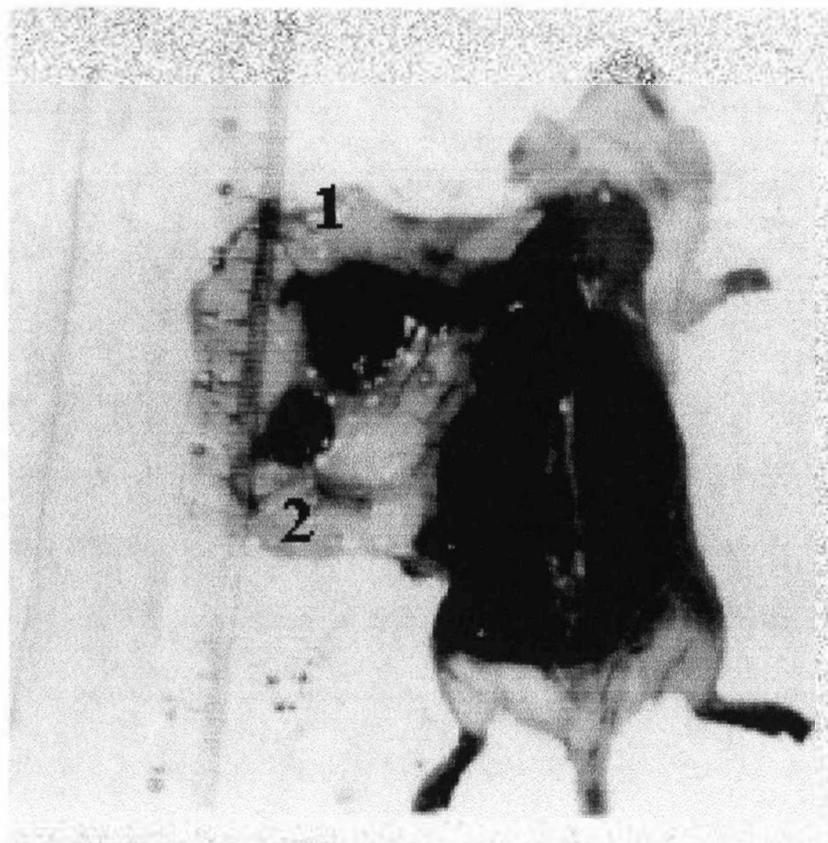


Figura 14. Teste de anafilaxia cutânea utilizando peçonhas nativa (1) e irradiada (2).

#### **4.12. Estudo da ação hemolítica da peçonha nativa e irradiada em eritrócitos humanos**

Os resultados mostraram que as peçonhas nativa e irradiada, na concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$ , apresentaram 50% e 2,5% de hemólise, respectivamente. Para se conseguir 50% de hemólise com a peçonha irradiada foi necessário que a mesma estivesse na concentração de 75  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.13. Determinação da pureza radioquímica das peçonhas, nativa e irradiada, marcadas com $^{99m}\text{Tc}$

Existe a formação de impurezas radioquímicas durante o processo de marcação de compostos com o  $^{99m}\text{Tc}$ . Quando a redução do  $^{99m}\text{Tc}$  é incompleta, há a formação do  $\text{TcO}_4^-$ , encontrado na forma livre na solução de marcação. Assim, o  $\text{TcO}_4^-$  não reduzido, não irá marcar os compostos em estudo (SAHA, 1992). Outra impureza radioquímica formada no processo de marcação é o  $\text{TcO}_2$  (tecnécio coloidal), que é bastante estável em solução aquosa e também não se complexa com os compostos em estudo.

Neste estudo, foi possível se determinar apenas a presença do  $\text{TcO}_4^-$ , tanto em cromatografia de camada delgada, quanto no HPLC, para as peçonhas nativa e irradiada. Este fato se deve à grande complexidade da peçonha de *Apis mellifera*, que apresenta componentes de diferentes pesos moleculares, que migram nas fitas cromatográficas ao longo de toda a sua extensão, e em HPLC de exclusão molecular, ocorre a eluição de seus compostos ao longo de toda a corrida cromatográfica, a partir do volume morto ( $V_0$ ) até próximo ao volume total da coluna. Entretanto, observou-se que a porcentagem de  $\text{TcO}_4^-$  formado analisada pelo sistema de cromatografia de camada delgada (3,2%) e em HPLC, foi reduzida, indicando que as marcações das peçonhas nativa e irradiada com  $^{99m}\text{Tc}$  foram bastante eficientes. Nas figuras 2, 15(A), 3 e 15(B) pode-se observar que os picos protéicos e os picos de radioatividade são coincidentes tanto para a peçonha nativa (Figs. 2 e 15 A), quanto para peçonha irradiada (Figs. 3 e 15 B), mostrando assim, que houve uma marcação eficiente dos compostos da peçonha de *Apis mellifera*, nativa e irradiada.

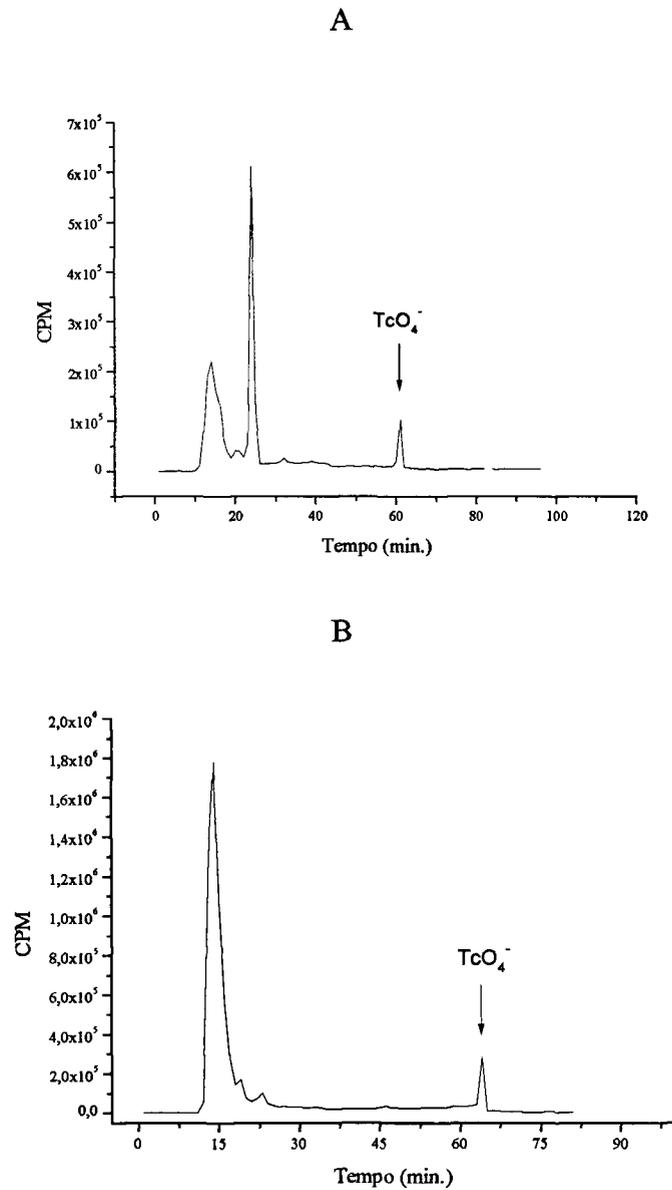


Figura 15. Perfil radiocromatográfico obtido por meio de cromatografia líquida de exclusão molecular de alto desempenho do extrato bruto das peçonhas nativa (A) e irradiada (B), marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ . A seta indica o pico correspondente ao  $\text{TcO}_4^-$ .

#### 4.14 Biodistribuição da peçonha nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$

Os dados obtidos de concentração sanguínea da peçonha nativa foram ajustados por meio de curvas utilizando-se uma combinação linear de dois termos exponenciais, cuja forma pode ser representada pela expressão geral:

$$Cs(t) = A_1 \times e^{-b_1xt} + A_2 e^{-b_2xt} + C_0$$

A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $C_0$  e dos coeficientes exponenciais  $b_1$  e  $b_2$  para a peçonha nativa, calculados por meio do programa computacional Origin, versão 5.0.

**Tabela 4.** Valores dos parâmetros do ajuste da curva de concentração sanguínea de peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$

Parâmetro	Valor calculado
$A_1$	8250000
$b_1$	0,022
$A_2$	-4478963
$b_2$	0,5
$C_0$	325873

Considerando-se que a equação encontrada para a concentração sanguínea segue o modelo de um processo cinético de primeira ordem, determinou-se o tempo de concentração sanguínea máxima ( $t_{\max}$ ) por meio da equação abaixo (Cid, 1982):

$$t_{\max} = \frac{\ln b_2/b_1}{(b_2 - b_1)}$$

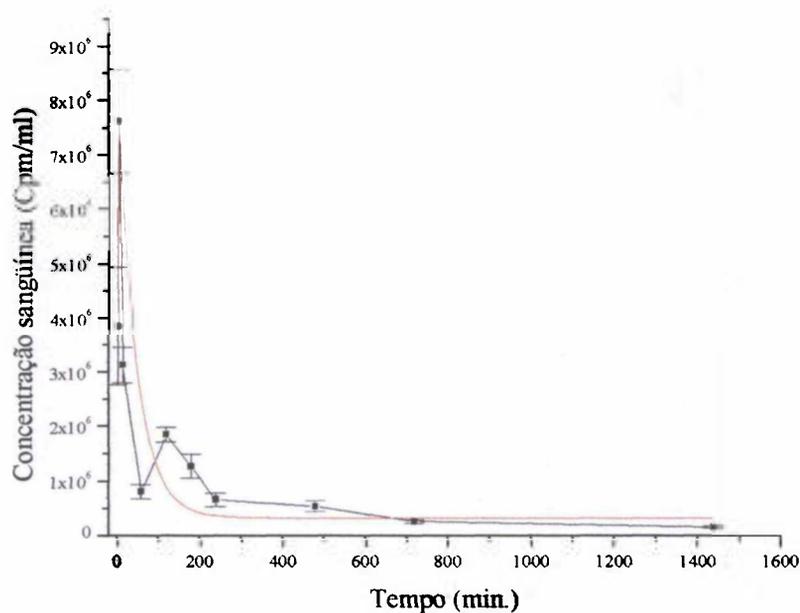
A peçonha nativa foi rapidamente absorvida, pois dentro de 6,53 minutos observou-se o pico máximo de concentração sanguínea, como mostrado pela Tabela 5 e a Figura 16.

A Tabela 6 mostra, em ordem decrescente, que sangue, rins e fígado, apresentaram as maiores quantidades de peçonha nativa em todos os intervalos de tempo, enquanto que baço, coração e cérebro apresentaram as menores quantidades de peçonha nativa. As maiores quantidades teciduais de peçonha nativa foram encontradas cerca de 5 minutos após a injeção.

**Tabela 5.** Concentração sanguínea de peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , após administração i.p., expressa em cpm/ml/ $10^3$ .

Tempo (min.)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Media $\pm$ DP
3	3491	2474	4618	4818	-	3850 $\pm$ 1087
5	-	6349	8063	7472	8568	7613 $\pm$ 954
15	3196	3498	2982	2649	3289	3122 $\pm$ 323
60	957	869	720	684	-	807 $\pm$ 127
120	1803	2001	1688	1905	-	1849 $\pm$ 134
180	1121	1638	1257	1193	1119	1265 $\pm$ 216
240	781	800	602	583	529	659 $\pm$ 123
480	456	547	617	416	650	537 $\pm$ 100
720	220	268	259	288	259	258 $\pm$ 24
1440	140	143	157	138	203	155 $\pm$ 27

DP- desvio padrão; n = 4-5 animais.



**Figura 16.** Concentração sanguínea da peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  em diferentes intervalos de tempo, após administração i.p. Os dados representam a média para 4-5 animais. A curva em vermelho representa o ajuste.

Tabela 6. Distribuição tecidual da peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , em diferentes intervalos de tempo, após a administração i.p. em camundongos. Dados expressos em porcentagem da dose injetada.

Tempo(min.)	Sangue	Rim	Fígado	Estômago	Músculo	Baço	Pulmões	Coração	Tireóide	Cérebro
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
3	10,42 $\pm$ 3,41	2,44 $\pm$ 1,71	4,88 $\pm$ 1,51	1,72 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,66	0,63 $\pm$ 0,21	0,55 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,01	0,057 $\pm$ 0,010
5	11,68 $\pm$ 3,26	6,04 $\pm$ 0,85	7,67 $\pm$ 0,68	1,06 $\pm$ 0,23	1,14 $\pm$ 0,23	0,56 $\pm$ 0,27	0,92 $\pm$ 0,24	0,59 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,12	0,105 $\pm$ 0,030
15	4,91 $\pm$ 0,65	7,02 $\pm$ 1,81	3,95 $\pm$ 0,67	1,31 $\pm$ 0,33	0,51 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,20	0,29 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,04	0,048 $\pm$ 0,020
60	1,52 $\pm$ 0,30	5,16 $\pm$ 1,01	2,23 $\pm$ 0,39	0,38 $\pm$ 0,10	0,24 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,008
120	3,11 $\pm$ 0,23	7,00 $\pm$ 0,36	7,60 $\pm$ 1,92	0,34 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,017 $\pm$ 0,005
180	1,88 $\pm$ 0,94	5,03 $\pm$ 1,84	3,75 $\pm$ 1,30	0,23 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,10	0,05 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,016 $\pm$ 0,005
240	1,11 $\pm$ 0,21	4,83 $\pm$ 0,50	3,73 $\pm$ 0,85	0,27 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,011 $\pm$ 0,001
480	1,21 $\pm$ 0,17	4,67 $\pm$ 0,29	3,17 $\pm$ 0,26	0,23 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,01	0,014 $\pm$ 0,003
720	0,44 $\pm$ 0,01	4,30 $\pm$ 0,01	2,61 $\pm$ 1,20	0,22 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,013 $\pm$ 0,004
1440	0,24 $\pm$ 0,01	2,31 $\pm$ 0,14	1,07 $\pm$ 0,15	0,21 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,012 $\pm$ 0,004

DP- desvio padrão; n= 4-5 animais

Utilizando-se do mesmo procedimento que para peçonha nativa, os dados obtidos da concentração sanguínea da peçonha irradiada foram ajustados por meio de curvas utilizando-se uma combinação linear de dois termos exponenciais, seguindo a mesma representação. A tabela 7 representa os valores dos parâmetros  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $C_0$  e dos coeficientes exponenciais  $b_1$  e  $b_2$  para a peçonha irradiada, calculados por meio do programa computacional Origin, versão 5.0.

**Tabela 7.** Valores dos parâmetros do ajuste da curva de concentração sanguínea de peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ .

Parâmetro	Valor calculado
$A_1$	4600000
$b_1$	0,0125
$A_2$	-4000000
$b_2$	0,81
$C_0$	325873

Considerando-se que a equação encontrada para a concentração sanguínea também segue o modelo de um processo cinético de primeira ordem, determinou-se o tempo de concentração sanguínea máxima ( $t_{\max}$ ) da mesma forma que para a peçonha nativa.

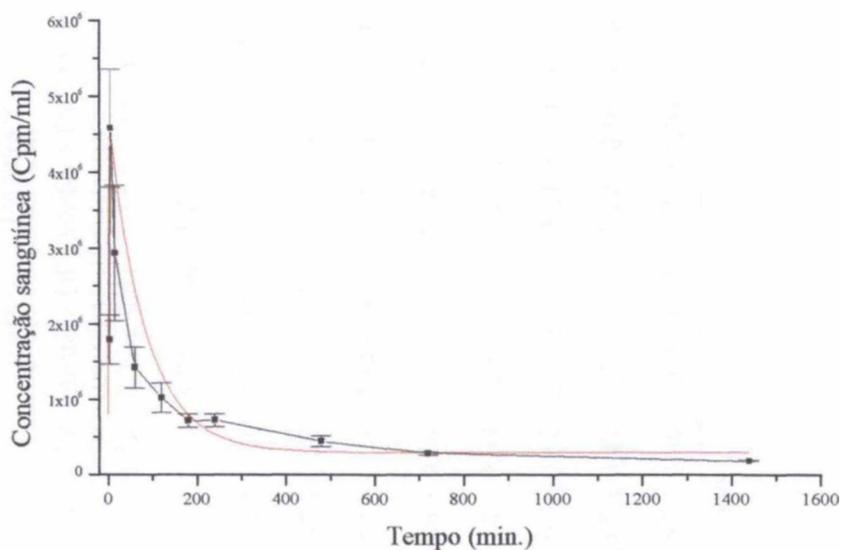
A peçonha irradiada também foi rapidamente absorvida, alcançando a concentração sanguínea máxima em 5,23 minutos, como pode ser observado na Tabela 8. e Figura 17.

A Tabela 9 mostra, em ordem decrescente, que sangue, rins e fígado apresentaram as maiores quantidades de peçonha irradiada em todos os intervalos de tempo, enquanto que baço, coração e cérebro apresentaram as menores quantidades de peçonha nativa. As maiores quantidades teciduais de peçonha irradiada foram encontradas cerca de 5 minutos após a injeção.

**Tabela 8.** Concentração sanguínea de peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , após administração i.p., expressa em  $\text{cpm/ml}/10^3$ .

Tempo (min.)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Media $\pm$ DP
3	1466	1797	-	2241	1662	1792 $\pm$ 329
5	4094	4249	4249	5952	4343	4577 $\pm$ 773
15	1391	3088	3103	3494	3584	2931 $\pm$ 889
60	1559	1721	1268	1537	1028	1422 $\pm$ 273
120	1124	-	1004	1199	755	1020 $\pm$ 194
180	829	768	634	659	-	722 $\pm$ 91
240	-	690	839	742	642	728 $\pm$ 84
480	493	478	392	527	351	448 $\pm$ 73
720	301	272	273	280	316	288 $\pm$ 19
1440	202	176	188	189	178	186 $\pm$ 10

DP- desvio padrão; n = 4-5 animais.



**Figura 17.** Concentração sanguínea da peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  em diferentes intervalos de tempo, após administração i.p. Os dados representam a média para 4-5 animais. A curva em vermelho representa o ajuste.

Tabela 9. Distribuição tecidual da peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , em diferentes intervalos de tempo, após a administração i.p. em camundongos. Dados expressos em porcentagem da dose injetada.

Tempo(min.)	Sangue		Rim		Fígado		Estômago		Músculo		Baço		Pulmão		Coração		Tireóide		Cérebro	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
3	7,29 ± 1,54	3,59 ± 0,52	5,72 ± 0,01	1,55 ± 0,36	1,02 ± 0,29	0,61 ± 0,04	0,53 ± 0,12	0,29 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,070 ± 0,010										
5	12,31 ± 5,94	7,96 ± 0,83	5,75 ± 0,40	1,25 ± 0,10	0,42 ± 0,06	0,79 ± 0,12	0,75 ± 0,24	0,36 ± 0,06	0,14 ± 0,04	0,045 ± 0,009										
15	5,20 ± 2,23	5,62 ± 1,11	2,71 ± 0,93	0,35 ± 0,28	0,47 ± 0,34	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,12	0,10 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,037 ± 0,020										
60	3,69 ± 0,42	4,45 ± 0,20	3,19 ± 0,87	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,08	0,06 ± 0,013	0,06 ± 0,02	0,024 ± 0,004										
120	2,25 ± 0,52	3,92 ± 0,79	2,64 ± 0,72	0,25 ± 0,05	0,21 ± 0,01	0,10 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,016 ± 0,003										
180	1,50 ± 0,59	3,56 ± 0,56	2,63 ± 0,66	0,24 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,015	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,011 ± 0,003										
240	1,72 ± 0,46	3,45 ± 0,69	2,50 ± 1,37	0,23 ± 0,02	0,10 ± 0,07	0,15 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,013 ± 0,003										
480	1,15 ± 0,25	3,00 ± 0,57	2,20 ± 0,23	0,23 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,014 ± 0,001										
720	0,78 ± 0,06	2,88 ± 0,43	2,30 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,10 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,012 ± 0,004										
1440	0,49 ± 0,02	1,60 ± 0,66	0,90 ± 0,35	0,20 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,18 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,012 ± 0,006										

DP- desvio padrão; n= 4-5 animais

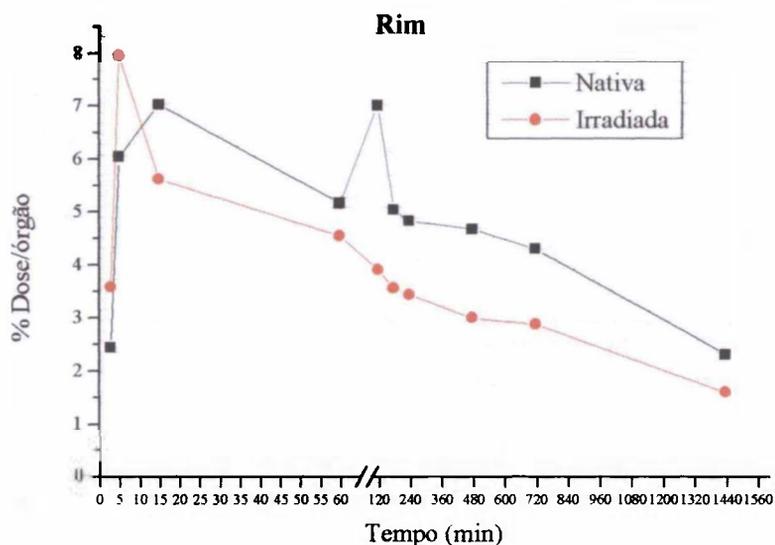
A tabela 10 mostra as porcentagens da dose aplicada das peçonhas nativa e irradiada marcadas, detectadas na urina e nas fezes.

**Tabela 10.** Excreção de peçonhas nativa e irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos (% Dose injetada)

Tempo (h)	4	8	24
<b>Nativa</b>	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Urina	16,24 $\pm$ 3,24	14,91 $\pm$ 0,30	29,87 $\pm$ 1,37
Fezes	3,50 $\pm$ 0,07	2,19 $\pm$ 0,34	16,78 $\pm$ 3,09
<b>Irradiada</b>	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Urina	74,60 $\pm$ 7,25	10,78 $\pm$ 1,96	10,10 $\pm$ 1,55
Fezes	23,93 $\pm$ 1,07	2,70 $\pm$ 0,56	4,71 $\pm$ 1,00

DP- desvio padrão; n = 4-5 animais.

As Figuras 18 a 26 representam os dados obtidos em porcentagem de dose/órgão, para as peçonhas nativa e irradiada, após a administração i.p.



**Figura 18.** Porcentagem da dose injetada, nos rins, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

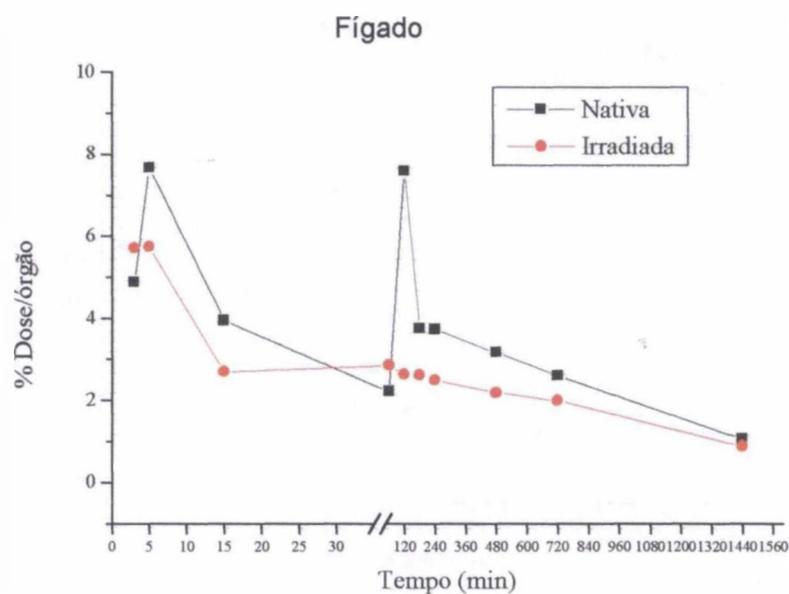


Figura 19. Porcentagem da dose injetada, no fígado, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

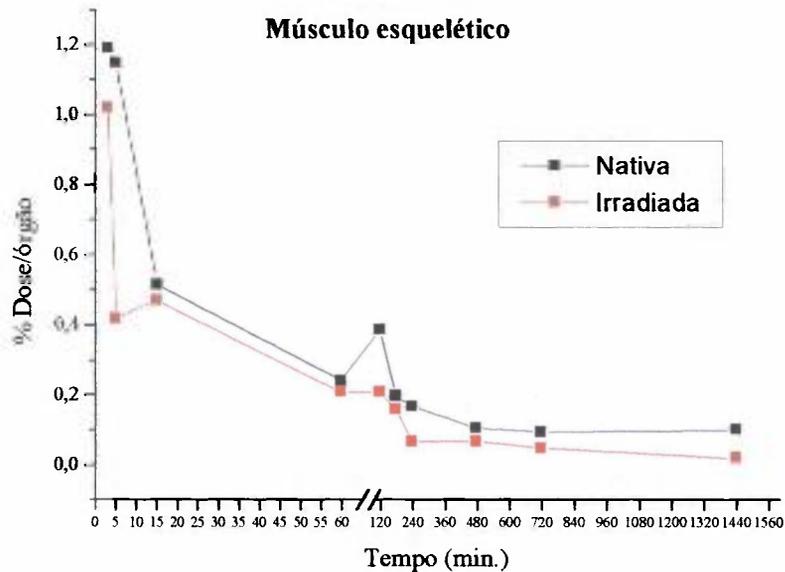


Figura 20. Porcentagem da dose injetada, no músculo esquelético, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

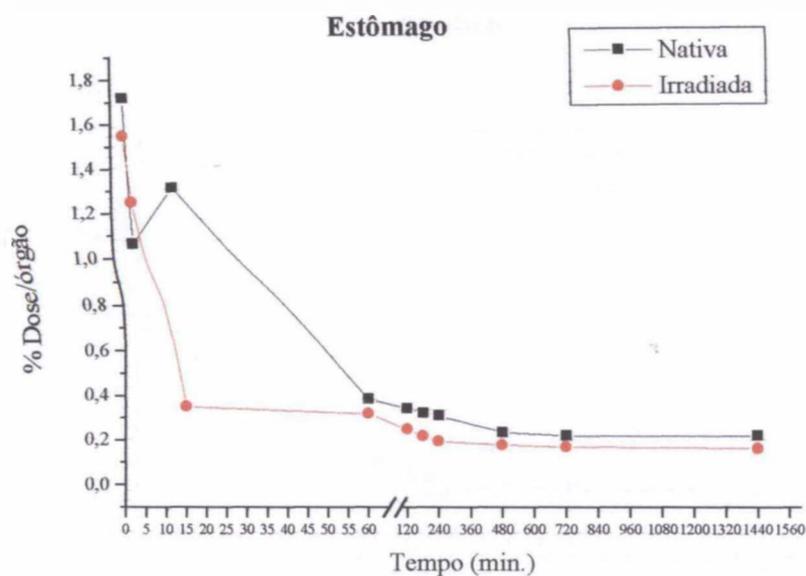


Figura 21. Porcentagem da dose injetada, no estômago, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

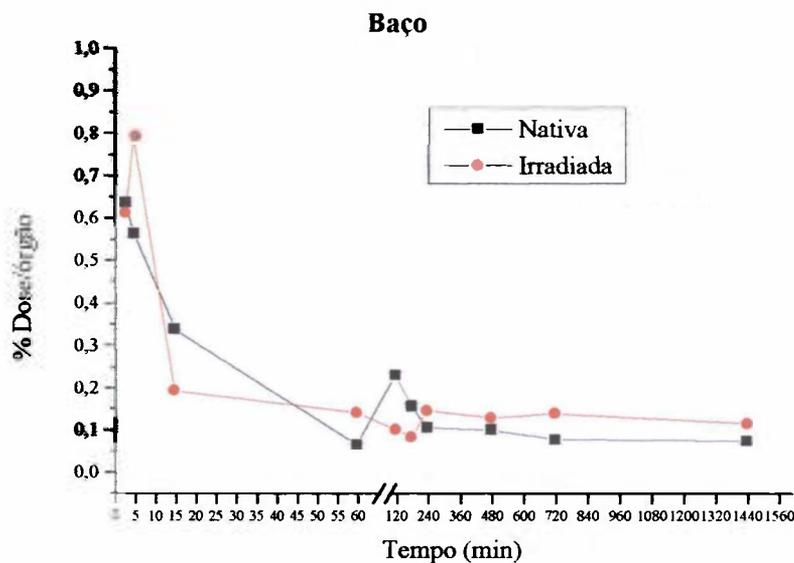


Figura 22. Porcentagem da dose injetada, no baço, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

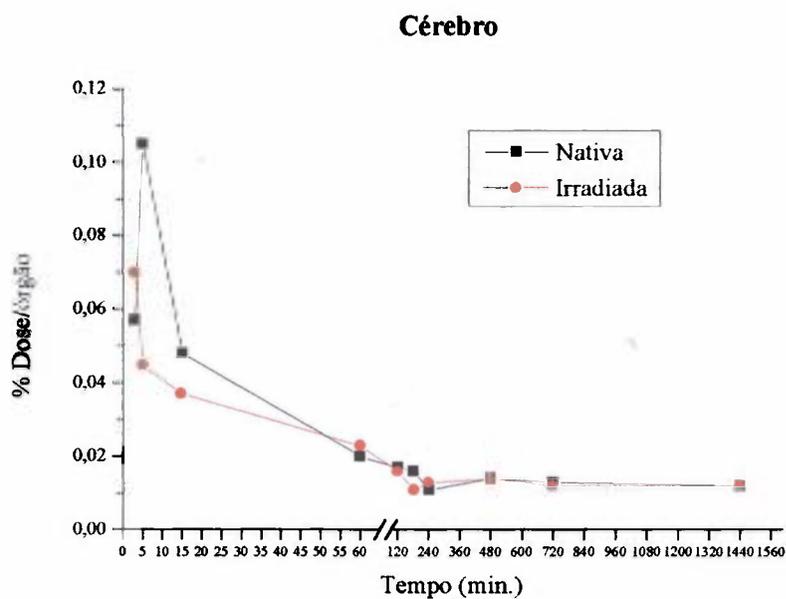


Figura 23. Porcentagem da dose injetada, no cérebro, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

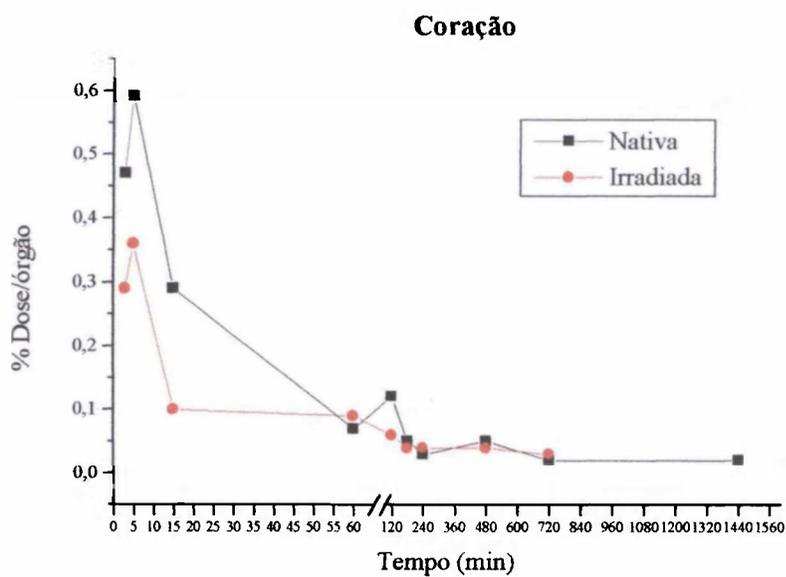


Figura 24. Porcentagem da dose injetada, no coração, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

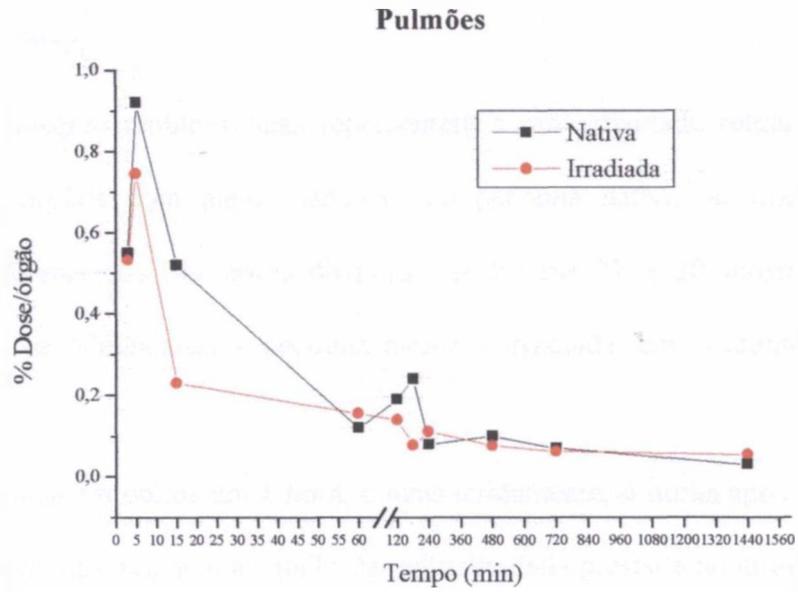


Figura 25. Porcentagem da dose injetada, nos pulmões, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

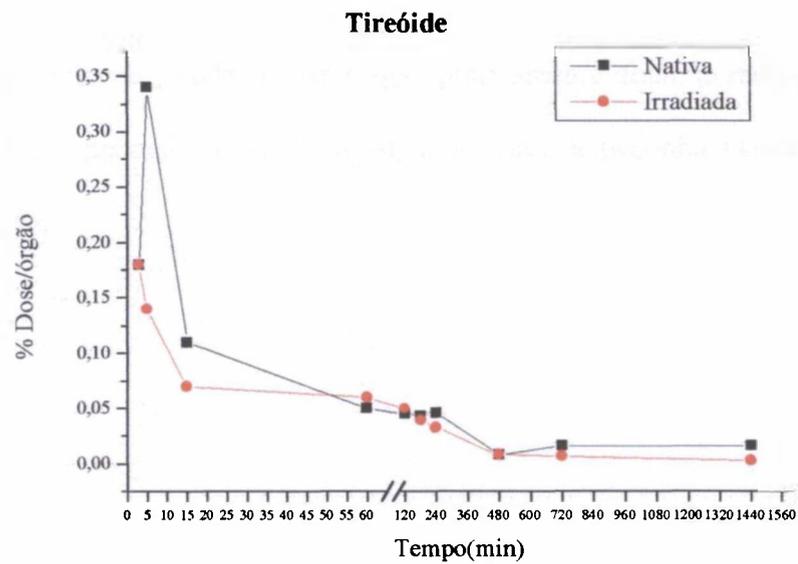


Figura 26. Porcentagem da dose injetada, na tireóide, após administração i.p. das peçonhas nativa ou irradiada marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ , em camundongos.

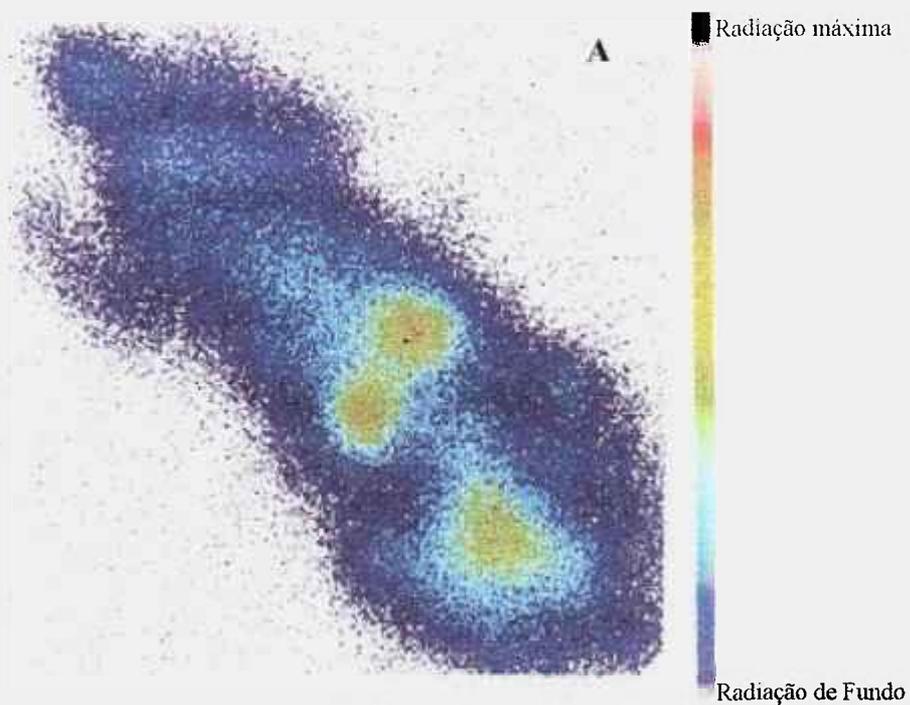
#### **4.15. Estudo das imagens cintilográficas das peçonhas nativa e irradiada marcadas com $^{99m}\text{Tc}$**

As imagens cintilográficas representam a radioatividade retida no organismo, sendo que os órgãos com maior captação de peçonha nativa ou irradiada marcada, mostram-se diferenciados por cores distintas. As figuras 27 a 30 mostram as imagens obtidas quando se administrou a peçonha nativa e irradiada, em diferentes intervalos de tempo.

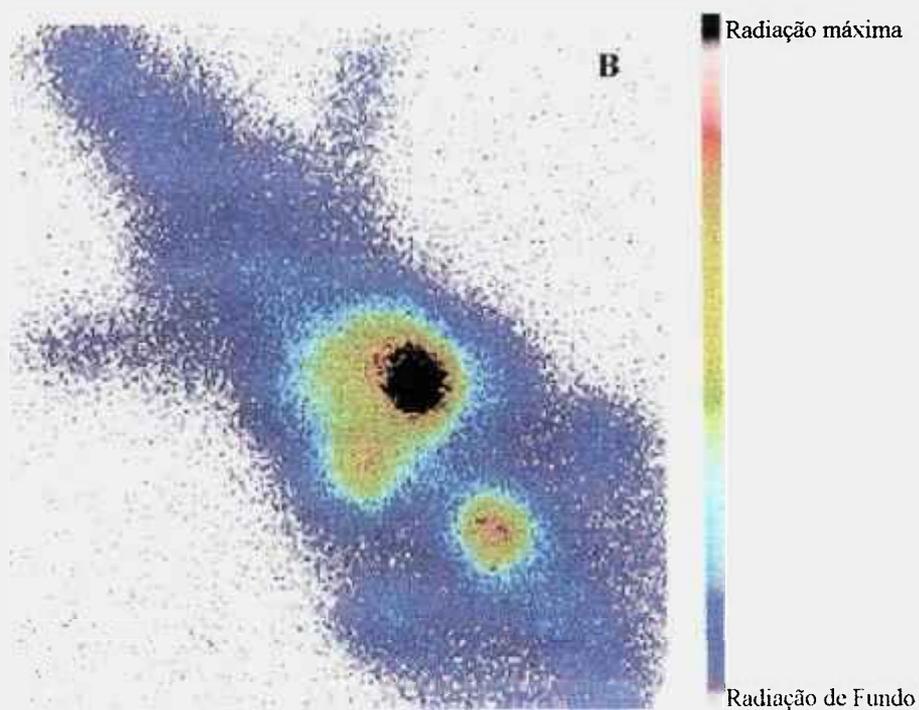
Na imagem obtida em 1 hora, e mais nitidamente, 4 horas após a administração da peçonha nativa, observa-se o acúmulo de radioatividade presente no intestino.

No grupo de animais que receberam peçonha irradiada, já em 1 hora observa-se radioatividade localizada na região do intestino, em diferentes focos, devido ao peristaltismo.

Em 24 horas, pode-se dizer que praticamente toda a radioatividade já foi eliminada, com um pequeno acúmulo renal, tanto para a peçonha nativa quanto para a peçonha irradiada.

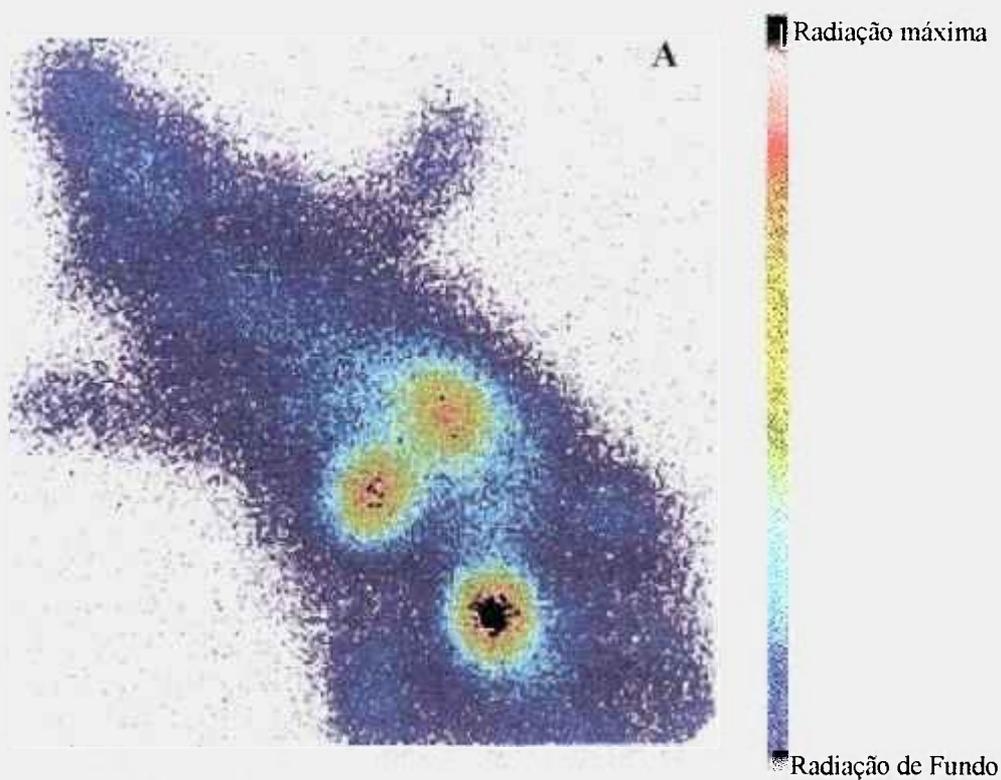


Tempo de leitura 35 min.

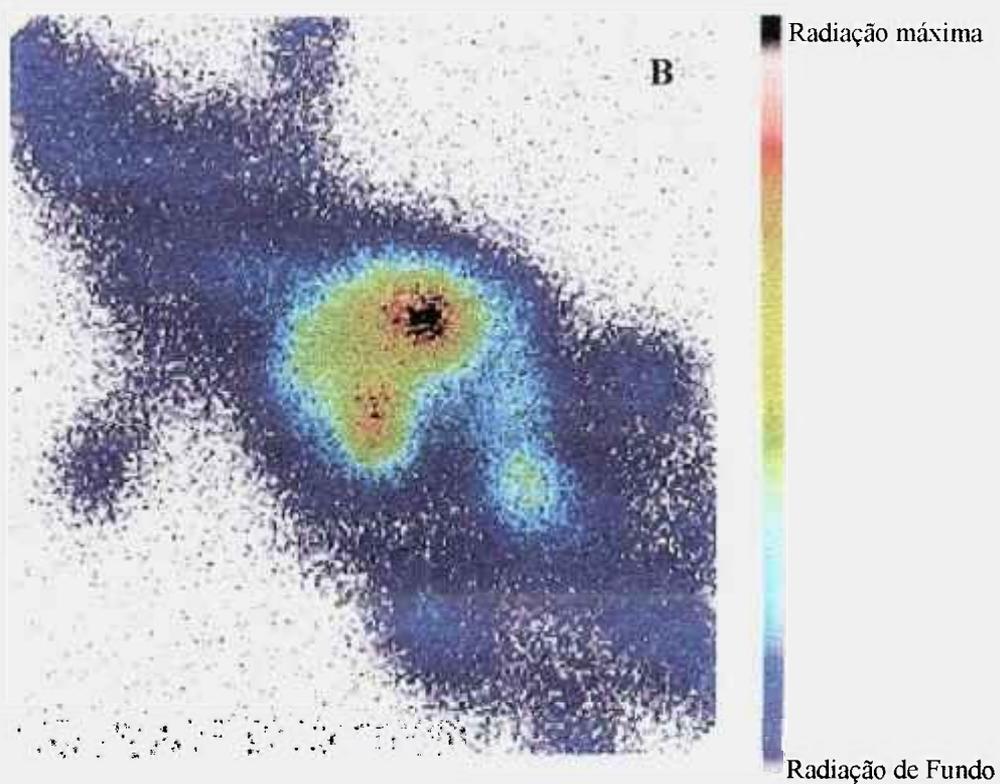


Tempo de leitura 49 min.

**Figura 27.** Imagens cintilográficas dos ratos que receberam peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (A) e peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (B) 30 minutos após a injeção.

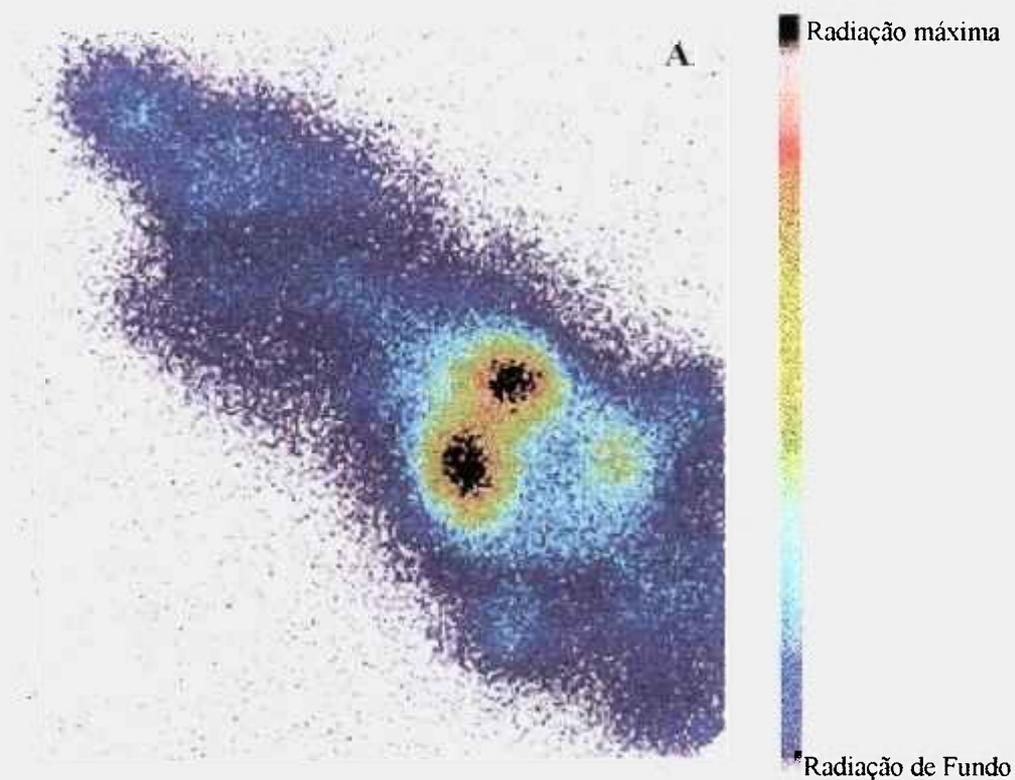


Tempo de leitura 42 min.

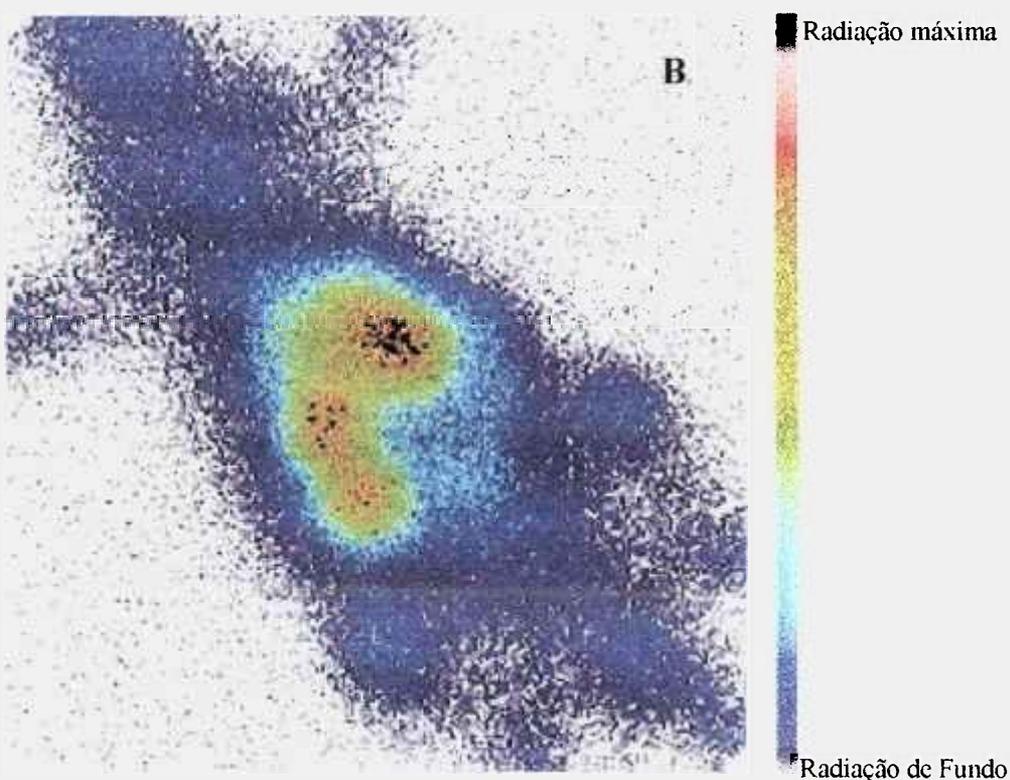


Tempo de leitura 65 min.

Figura 28. Imagens cintilográficas dos ratos que receberam peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (A) e peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (B) 1 hora após a injeção.

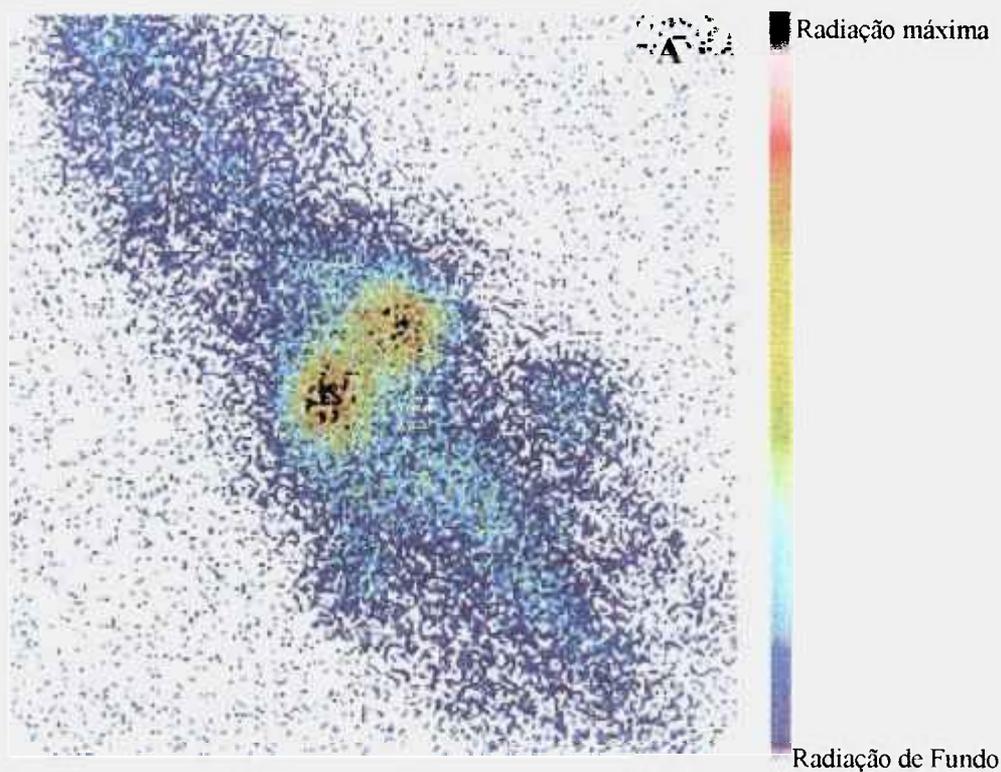


Tempo de leitura 100 min.

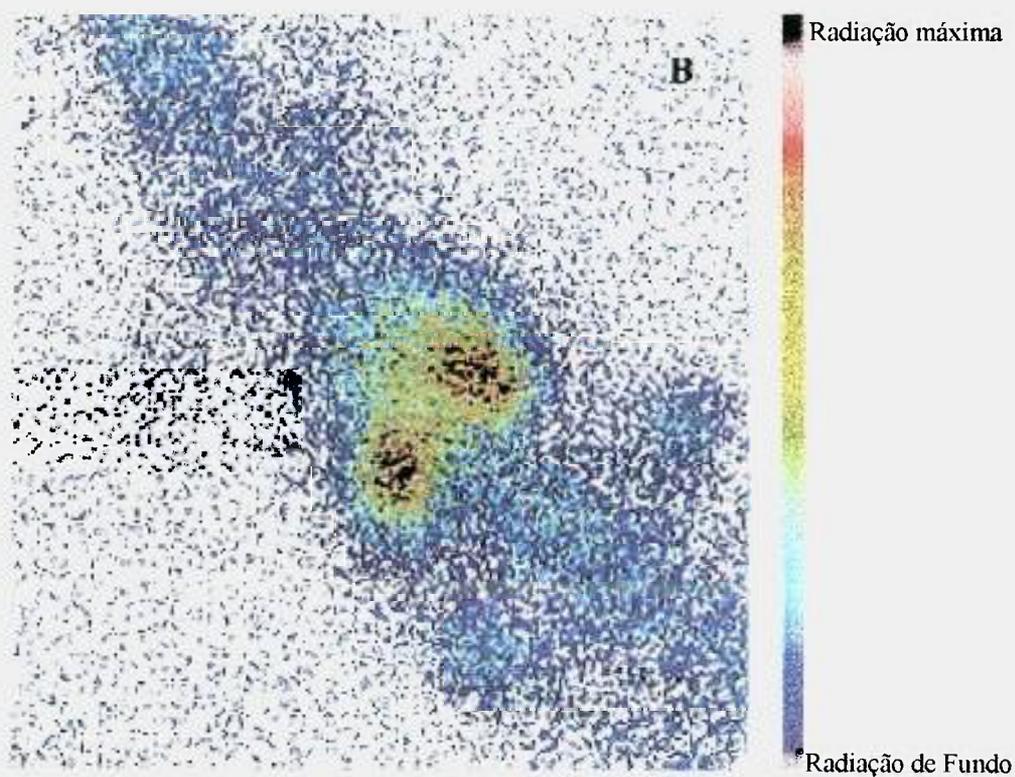


Tempo de leitura 128 min.

Figura 29. Imagens cintilográficas dos ratos que receberam peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (A) e peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (B) 4 horas após a injeção.



Tempo de leitura 419 min.



Tempo de leitura 646 min.

Figura 30. Imagens cintilográficas dos ratos que receberam peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (A) e peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  (B) 24 horas após a injeção.

## 5. DISCUSSÃO

As concentrações protéicas das amostras nativa e irradiada não foram diferentes, mostrando assim, que não houve perda do conteúdo protéico da amostra submetida à irradiação gama na dose de 2 kGy. Após a irradiação não foi observada a presença de nenhum tipo de material insolúvel. Estes dados estão de acordo com os obtidos para toxinas isoladas de peçonha de serpentes (Costa, 1988, Boni- Mitake *et al.*, 1999, Spencer, 2000). Este comportamento difere da crotoxina onde se observou a formação de agregados. A crotoxina, em estado nativo apresenta-se pouco solúvel, e as alterações decorrentes da irradiação a tornam ainda mais insolúvel, sugerindo que a diminuição da solubilidade envolve aminoácidos carregados da superfície da molécula. Para a peçonha de *Apis mellifera*, o problema de solubilidade não ocorre.

As proteínas, em geral, absorvem luz em comprimentos de onda na região ultravioleta (situados entre 180 e 300 nm), devido à presença de cromóforos. Existem dois picos máximos de absorvância nesta região, sendo um em 200 nm e outro em 280 nm. Entre 190 e 200 nm, o espectro de uma proteína reflete a absorção das ligações peptídicas, sendo influenciada pela conformação do estado nativo da proteína (Smith, *et al.*, 1985). Entre 250 e 300 nm (com pico máximo pico em 280 nm) a absorção deve-se, principalmente aos grupos R dos aminoácidos aromáticos.

A análise espectrofotométrica de absorção da peçonha de *Apis mellifera* irradiada na região ultravioleta, mostrou um aumento na absorção na região de 230 a 350 nm, devido a uma maior exposição dos grupos cromóforos. Este fenômeno se deve, possivelmente, às modificações nas estruturas secundárias e terciárias das proteínas, com o desdobramento das cadeias polipeptídicas (Fig. 1). O espectro obtido para a peçonha de *Apis* irradiada foi semelhante aos obtidos para peçonhas irradiadas de serpentes indianas

(Baride et al., 1980), *Crotalus durissus terrificus* (Murata, 1988) e crotamina (Boni-Mitake et al., 1999). Estes dados sugerem que o aumento de absorção na região ultravioleta causado pela radiação gama é um fenômeno inespecífico para proteínas irradiadas (Boni-Mitake, 2000).

Os perfis de eluição das peçonhas nativa e irradiada em HPLC-SE (Figs. 2 e 3) mostram 5 picos predominantes. Pode-se sugerir, como base nos perfis de eluição da PLA<sub>2</sub> e melitina padrões (Fig. 4), que os picos de tempo de retenção 13,38/13,40 minutos e 15,16/15,21 minutos contêm, respectivamente, PLA<sub>2</sub> e melitina.

Observa-se que no perfil da peçonha irradiada, há um aumento da área do pico de tempo de retenção 13,40 minutos, podendo-se inferir que parte da fração eluída no tempo de retenção 15,21 minutos pode ter sofrido mudanças conformacionais, com aumento do peso molecular aparente.

As amostras nativa e irradiada foram então submetidas a HPLC-RP, empregando-se gradiente linear de água/acetonitrila contendo ácido trifluoroacético (Figs. 5 A e 5 B). No perfil obtido para a peçonha irradiada, observou-se que houve um aumento da área do pico correspondente ao tempo de retenção de 23,55 minutos e diminuição na área do pico correspondente ao tempo de retenção de 24,14 minutos. Esta alteração sugere mudanças na hidrofobicidade das frações que contém a PLA<sub>2</sub>. Pode-se aventar que a radiação poderia ter causado um desdobramento das cadeias destas moléculas, propiciando uma mudança na exposição de seus grupos hidrofóbicos.

Em relação à melitina, para a peçonha irradiada, a diminuição na área do pico correspondente ao tempo de retenção 29,79 minutos sugere também variações na polaridade da superfície da molécula.

A análise eletroforética foi realizada utilizando-se gel em condições desnaturantes em sistema descontínuo. Optou-se por esta técnica, pois esta apresenta uma

boa resolução para proteínas de baixo peso molecular, que são os principais componentes desta peçonha.

O perfil mostrado na Figura 7, para a peçonha irradiada revelou uma banda que não estava presente no perfil da peçonha nativa. Isto indica que poderia ter ocorrido uma mudança conformacional em um dos compostos da peçonha irradiada alterando assim, seu peso molecular aparente. Deve-se ressaltar que foram aplicadas as mesmas quantidades de peçonha nativa e irradiada nos poços.

Os principais componentes tóxicos da peçonha de abelhas são a melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub>, que agem sinergisticamente, causando a lise de eritrócitos, embora a PLA<sub>2</sub> atue de forma indireta. Os dados de hemólise obtidos neste estudo mostraram que após a irradiação, atividade hemolítica da peçonha diminuiu cerca de três vezes (item 4.12). Estes dados indicam que podem ter ocorrido alterações conformacionais nas moléculas de PLA<sub>2</sub> e, principalmente, melitina comprometendo, desta maneira, a atividade lítica da peçonha irradiada. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em HPLC-RP, onde foi observada uma mudança na hidrofobicidade destes compostos após a irradiação da peçonha, sugerindo alteração na estrutura secundária das moléculas. Esta alteração pode envolver o sítio lítico da melitina principalmente, influenciando assim, a atividade hemolítica.

A atividade fosfolipásica da peçonha irradiada apresentou-se cerca de 30 % menor que da peçonha nativa (Tab. 1), corroborando a sugestão de que a irradiação gama tenha causado mudanças estruturais nesta molécula, afetando seu sítio ativo. Contudo as alterações estruturais não aboliram totalmente sua atividade catalítica.

Na análise da DL<sub>50</sub> da peçonha nativa encontrou-se o valor de 5,97 mg/kg, após a administração intraperitoneal em camundongos Swiss (Tab. 2) e de 2,25 mg/kg em camundongos da linhagem B6D2F1 (Tab. 3). Os valores descritos em literatura são muito

variados. As interpretações dos resultados ficam comprometidas, pois são fornecidos poucos detalhes a respeito dos materiais e metodologias empregadas. São poucos os relatos que contém detalhes e estes muitas vezes são limitados pelo número baixo de animais empregados nos estudos (Schmidt, 1995). Além disso, lotes provenientes de diferentes colônias, apresentam valores de DL<sub>50</sub> muito variados, podendo ser significativamente maiores, dependendo da quantidade de peçonha proveniente de abelhas imaturas. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos após a administração da peçonha em camundongos foram de 3,5 mg/kg, podendo chegar a 6 mg/kg, para diferentes lotes de peçonha. Schumacher **et al.** (1990) obtiveram valores entre 2,17 a 7,1 mg/kg, dependendo da colônia de onde provinha a peçonha e da susceptibilidade da linhagem de camundongo utilizado no ensaio. Schmidt (1995) encontrou o valor 2,8mg/kg quando administrou a peçonha em camundongos Swiss. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos após administração intraperitoneal da peçonha de abelhas africanizadas foram similares aos determinados quando se utilizou a via endovenosa (Schumacher, **et al.**, 1990; Schmidt, 1995).

Tem sido bastante descrito na literatura que a irradiação de peçonhas de serpentes e toxinas isoladas causam diminuição da toxicidade (Puranananda, 1972; Kankonkar, **et al.**, 1975; Gaitonde **et al.**, 1975; Baride **et al.**, 1980; Herrera **et al.**, 1986; Guarnieri-Cruz **et al.**, 1990; Hati **et al.**, 1989; Murata **et al.**, 1990; Souza-Filho **et al.**, 1992; Nascimento **et al.**, 1996; Clissa **et al.**, 1999; Boni-Mitake **et al.**, 1999). O valor de DL<sub>50</sub> para a peçonha de *Apis mellifera* irradiada foi cerca de 2 vezes maior que o da nativa, quando se utilizou a linhagem Swiss e 3 vezes maior, quando se utilizou a linhagem B6D2F1. A diminuição da toxicidade pela radiação gama de <sup>60</sup>Co após administração em camundongos Swiss, também de cerca de 2 vezes, foi descrita para a crotovina (Souza-Filho **et al.** 1992 e Nascimento **et al.**, 1998) e para a crotamina (Boni-Mitake, **et al.**, 1999).

A diminuição da toxicidade da peçonha irradiada pode ser devido às alterações estruturais, como sugeridas pelos resultados de espectrometria de absorção UV e HPLC-RP. Assim sendo, pode-se sugerir que estas alterações estruturais nos componentes da peçonha poderiam promover a atenuação da mesma.

Observa-se que os anti-soros formados contra a peçonha irradiada apresentaram absorvâncias detectáveis até a diluição de 1:6400 e 10000 para camundongos das linhagens Swiss e B6D2f1, respectivamente, e os anti soros formados contra a peçonha nativa apresentaram absorvâncias até a diluição de 1:3200 e 1:10000, para camundongos das linhagens Swiss e B6D2f1, respectivamente (Figs. 8 a 11). Os títulos dos soros obtidos contra a peçonha nativa são baixos, porém estão de acordo com os descritos por Schumacher *et al.* (1990; 1994); Schmidt, 1995), em experimentos realizados com coelhos e camundongos. A baixa quantidade de IgG detectadas para peçonha de *Apis mellifera* tem sido atribuída à grande quantidade de material de baixo peso molecular presentes na peçonha, correspondentes a cerca de 70 % da peçonha (Schmidt, 1995). Os baixos títulos de anticorpos apresentados tanto para a peçonha nativa quanto para a peçonha irradiada, indicam que as mudanças conformacionais que podem ter ocorrido nos constituintes da peçonha após a irradiação, não resultaram em alteração da imunogenicidade da peçonha irradiada.

Existem compostos na peçonha de abelhas que podem causar liberação dos grânulos de histamina dos mastócitos, como o peptídeo MCD e a PLA<sub>2</sub>, mesmo quando presentes em baixas concentrações. A liberação de histamina, por sua vez, produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, causando extravasamento de sangue ao redor da área de sensibilização. Esse extravasamento pode ser visualizado através da administração endovenosa do corante Azul de Evans. Quando se compara o extravasamento causado pelas peçonhas nativa e irradiada, verifica-se que este é maior

quando se administra a peçonha nativa (Fig. 12 a 14). Já para a peçonha irradiada o extravasamento apresenta diâmetro menor. Estes dados estão de acordo com a diminuição da toxicidade observada para peçonha irradiada, relacionada com a atenuação da atividade de seus compostos.

A Tabela 6 e as Figuras 18 a 26 mostram os resultados da biodistribuição da peçonha nativa marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , administrada via i.p., em diferentes intervalos durante 24 horas. A peçonha foi detectada, em ordem decrescente, nos seguintes órgãos: sangue, rim, fígado, estômago, pulmão, baço, coração e cérebro. Deve-se salientar que a radioatividade apresentada nos órgãos deve-se a peçonha marcada, visto que a porcentagem de Tc livre na marcação foi baixa (3%) (Fig. 15 A). A quantidade de peçonha nativa marcada mostrou que esta foi absorvida rapidamente, pois dentro de 5 minutos após sua administração foi detectado o pico máximo de radioatividade sanguínea. (Figura 16).

As quantidades de peçonha nativa marcada detectada no sangue diminuíram rapidamente até 1 hora, apresentando outro pico de radioatividade em 2 horas, diminuindo rapidamente até 4 horas e depois mais lentamente entre 4 e 24 horas. Assim, pode-se sugerir que houve metabolismo e/ou eliminação da peçonha nativa marcada dentro de 24 horas.

A radioatividade detectada nos órgãos diminuiu rapidamente até 1 hora, apresentando outro pico de radioatividade em 2 horas, diminuindo rapidamente entre 2 e 4 horas e depois mais lentamente entre 4 e 24 horas, similarmente ao que ocorre com o perfil sanguíneo. Este aumento na quantidade de peçonha nativa marcada detectada em 2 horas sugere que pode estar havendo uma redistribuição da mesma. Desta forma, a peçonha poderia estar em um reservatório transcelular, como o trato gastrointestinal. Observando-se o perfil de radioatividade apresentado pelo estômago, nota-se que ocorre um pico máximo

de radioatividade em 15 minutos com diminuição nos tempos subseqüentes, sem, entretanto, se notar o pico de 2 horas, constatado nos demais órgãos e tecidos.

As quantidades de peçonha nativa encontradas no fígado sugerem que a mesma tenha metabolismo hepático.

O perfil de radioatividade da peçonha nativa detectada nos rins durante 24 horas sugerem que a mesma e/ou um possível metabólito esteja sendo eliminada pelos rins, não podendo ser descartado que algum composto da peçonha tenha metabolismo renal. Não se pode descartar que a radioatividade detectada nos rins possa ser atribuída à presença de  $^{99m}\text{Tc}$  livre, porém é pouco provável, visto a baixa captação tireoidina, órgão de captação deste elemento e, além disso, o perfil da radioatividade renal é similar ao do sangue e ao do fígado.

As quantidades de peçonha nativa detectadas no músculo esquelético confirmam que esta se deve à presença de peçonha, pois dentre os efeitos farmacológicos causados pela  $\text{PLA}_2$  e pela melitina, está a proteólise muscular, que pode ocorrer em uma escala de tempo que varia de minutos à algumas horas. Isto confirma a seletividade da peçonha por este tecido.

A peçonha nativa foi detectada nos pulmões, baço, coração e cérebro em quantidades muito pequenas e os perfis de radioatividade para estes órgãos foram similares ao do sangue e demais órgãos.

A peçonha nativa possui atividade hemolítica devido principalmente à presença de  $\text{PLA}_2$  e melitina. A fim de verificar se a marcação da peçonha nativa com  $^{99m}\text{Tc}$  comprometeria sua atividade biológica, foi realizado o teste de hemólise, comparando-se a capacidade hemolítica da peçonha nativa marcada e não marcada. Foi realizada a marcação da peçonha nativa nas mesmas condições dos experimentos de biodistribuição e verificou-se que a porcentagem de hemólise causada pela peçonha marcada foi a mesma da peçonha

não marcada, ou seja, 100% de hemólise, para as quantidades de peçonha utilizada nos ensaios (250 µg de proteína).

A Tabela 9 e as Figuras 18 a 26 mostram os resultados da biodistribuição da peçonha irradiada marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , administrada via i.p., em diferentes intervalos durante 24 horas. A peçonha foi detectada, em ordem decrescente, nos seguintes órgãos: sangue, rim, fígado, estômago, pulmão, baço, coração e cérebro, similarmente a peçonha nativa, embora a radioatividade detectada em todos os órgãos tenha sido menor que para a peçonha nativa.

Deve-se salientar que a radioatividade apresentada nos órgãos deve-se a peçonha irradiada marcada, visto que a porcentagem de Tc livre na marcação foi baixa (3%) (Fig. 15 B).

A quantidade de peçonha irradiada marcada mostrou que esta também foi absorvida rapidamente, pois dentro de 5 minutos após sua administração foi detectado o pico máximo de radioatividade sanguínea. (Figura 17).

A quantidade de peçonha irradiada marcada no sangue diminuiu rapidamente até 1 hora e mais lentamente entre 1 e 24 horas. Não foi verificado o pico de radioatividade em 2 horas, como ocorre para a peçonha nativa. O perfil de radioatividade obtido para estômago não apresenta um pico de radioatividade em 15 minutos, mas uma porcentagem de radioatividade constante entre 15 minutos e 2 horas. Embora não possa ser descartada a possibilidade de haver redistribuição para a peçonha irradiada, esta pode estar ocorrendo em uma escala muito menor do que ocorre com a peçonha nativa.

A quantidade de peçonha irradiada excretada detectada na urina nas primeiras 4 horas após a administração foi de cerca 70%, enquanto para a nativa esta foi de 16 % (Tabela 10). Assim, a eliminação da peçonha irradiada por via renal, mostrou-se mais rápida que a da peçonha nativa. Estes dados sugerem que as alterações estruturais causadas

pela radiação na peçonha poderiam alterar o processo de excreção, o que poderia explicar a menor toxicidade encontrada para esta peçonha. Os resultados obtidos na cintilografia confirmam que a eliminação das peçonhas nativa e irradiada é por via renal (Figs. 27 a 30).

A quantidade peçonha irradiada marcada detectada no músculo esquelético foi menor que detectada para a peçonha nativa, o que está de acordo com a redução de toxicidade encontrada para peçonha nativa.

Similarmente à peçonha nativa, foram detectadas quantidades muito pequenas da peçonha irradiada nos pulmões, baço, coração e cérebro e os perfis de radioatividade para estes órgãos foram similares ao do sangue e demais órgãos.

## 6. CONCLUSÕES

A radiação gama não alterou a concentração protéica da peçonha de *Apis mellifera*, nem levou a formação de agregados insolúveis.

Os resultados de espectrometria U.V., eletroforese e cromatografia líquida de alto desempenho sugerem que a radiação gama pode ter causado mudanças estruturais nos compostos da peçonha de abelha.

A radiação gama atenuou a toxicidade da peçonha de abelha em cerca de duas a três vezes, dependendo da linhagem de camundongo utilizada no ensaio de toxicidade.

As alterações estruturais que podem ter ocorrido nos componentes da peçonha após a irradiação, poderiam promover a atenuação da mesma.

As mudanças conformacionais que podem ter ocorrido nos constituintes da peçonha após a irradiação, não resultaram em alteração da imunogenicidade da peçonha irradiada.

A marcação das peçonhas nativa e irradiada com  $^{99m}\text{Tc}$  não aboliu a atividade biológica das mesmas.

Os estudos de biodistribuição mostraram que as peçonhas nativa e irradiada foram rapidamente absorvidas, sugerindo também que ambas tiveram metabolismo hepático e eliminação e/ou metabolismo renal.

Para a peçonha nativa, sugere-se que pode ocorrer redistribuição da mesma, o que não parece ocorrer para a peçonha irradiada.

A peçonha irradiada foi eliminada mais rapidamente e este fato poderia explicar a diminuição da toxicidade observada para esta peçonha.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. E.; ALDRICH, J. E.; BISBY, R. H.; CUNDALL, R. B.; REDPATH, J. L. & WILLSON, R. L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions of inorganic anions with amino acids. **Radiat. Res.** v. 49, p. 278-289, 1972a.
- ADAMS, G. E.; BISBY, R. H.; CUNDALL, R. B.; REDPATH, J. L.; WILLSON, R. L. & Selective free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of ribonuclease. **Radiat. Res.** v. 49, p. 290-299, 1972b.
- ALTMAN, P., DITTMER, D. editores **Blood and other body fluids**. Washington, D.C., Dittmer, 1961.
- ALTMANN, F., KUBELKA, V., STUDACHER, E., UHL, K. & MÄRZ, L. Characterization of the isoforms of phospholipase A<sub>2</sub> from honeybee venom. **Insect Biochem.**, v. 21, n. 5, p.467-472, 1991.
- ANDRIANI, E. P. **Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas**. São Paulo, 1995. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).
- AUNG-KHIN, M.; LWIN-OHN, K. & ZIN, T. Immunogenicity of the toxoid of Russel's viper venoms. **The snake**, v. 12, p. 45-53, 1980.
- BANKS, B. E. C. & SHIPOLINI, R. A. Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera**, London Acad. Press, p.329-416, 1986.
- BARBONI, E. KEMENY, D. M.; CAMPOS, S. & VERNON, C. A. The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifera*). **Toxicon**, v. 25, n. 10, p. 1097-1104, 1987.
- 
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: referências bibliográficas**. Rio de Janeiro, 1989, 19 p.

- BARIDE, R. M.; JAIN, S. D. & GAITONDE, B. B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. **Indian J. Med. Res.** v. 72, p. 571-576, 1980.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1994. p. 339-344.
- BISBY, R. H.; CUNDALL, R. B.; ADAMS, G. E. & REDPATH, J. L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of subtilisin Calberg and subtilisin Novo. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.** v. 70, p. 2210-2218, 1974.
- BONI-MITAKE, M. **Estudos bioquímico e farmacológico das crotaminas nativa e irradiada com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$** . São Paulo, 2000 Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- BONI-MITAKE, M., COSTA, H., SOUZA, C.F., VASSILIEFF, V. S. & ROGERO, J. R. Ionizing radiation effect on crotonamine. In: CONGRESSO GERAL DE ENERGIA NUCLEAR, VII, Belo Horizonte. **Anais...** Associação Brasileira de Energia Nuclear, 1999, 4 p.
- BRADRICK, T. H. D., FREIRE, E. & GEORGHIOU, S. A high sensitivity differential scanning calorimetric study of the interaction of melittin with dipalmitoylphosphatidylcholine. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1, n. 982, p. 94-102, 1989.
- BUTLER, J. HOEY, B.M. & SWALLOW, A. J. Radiation chemistry. **Ann. Rep. Progress Chem.** v. 83, p. 129-175, 1987.
- 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, 273-282, 1984.
- CASTRO, F. F. M.M., PALMA, M. S., BRAGA, M. R. B., MALASPINA, O., LAZARETTI, J., ZUPPI, L. J., COSSERMELLI, W. & CROCE, J. Caracterização dos componentes das peçonhas de abelhas (*Apis mellifera*) e vespas (*Polistes versicolor*) e estudo da reatividade antigênica cruzada. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 16, p. 128-133, 1993.

- CHANDERKAR, L. P., GURNANI, S. & NADKARNI, G.B. The involmente of aromatic amino acids in biological activity of bovine fibrinogen as assessed by Gamma irradiation. **Radiation Res.** v. 65, p. 283-291, 1976.
- CHI, J. Y. **Estudo da imunidade adquirida a veneno de abelha (*Apis mellifera*) em apicultores.** São Paulo 1995.. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
- CID, E.C. **Introduccion a la farmacocinetica.** OAS, Washington, Ed. Chesneau , E., 1982.
- CLISSA, P.B., NASCIMENTO, N. , ROGERO, J.R. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. **Toxicon**, v. 37, 1131-41, 1999.
- COHEN, S.; KANDEKARO, M.; TERRELL, M. L. GARY, H. J. R. & EISENBERG, H. M. Effect of apamin on local rates of glucose utilization in the brain and the spinal cord in rats. **Neurosc. Letters**, v. 91, n. 3, p. 253-258, 1988.
- COSTA, H. **Caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Agelaia p. pallipes* (Hymenoptera-Vespidae).** Rio Claro, 1996. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências - UNESP.
- COSTA, L. M.; TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S. F. C.; BERRA, J. A. P.; ADELINA, M. G. F.; SOERENSEN, B.; PINTO, J. R. VANCETTO, M. D. C. Study of immune response in horse immunized with *Crotalus durissus terrificus*, in natura, submitted to formaldehyde treatment and thermic action. **Vacinas Soros**, v. 1, p. 24-29, 1985.
- COSTA, T. A. **Efeitos da radiação ionizante na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.** São Paulo, 1988. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- CZAPSKI, G. On the use of OH scavengers in biological systems. **Isr. J. Chem.** v.24, p. 29-32, 1984.
- DANIEL, J. P.; HENEINE, L. G. D. TAVARES, C. P. A.; NASCIMENTO, M. C. S. & HENEINE, I.F. Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 20, 713-720, 1987.

- DETINGER, H. & JUNG, H. The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. In: DERTINGER, H. & JUNG, H. **Molecular Radiation Biology**. Berlin, Springer-Verlag, Ch. 9, p. 115-133, 1970.
- DIMITROV, G. D. & NATCHEV, I. A. Fractionation of some bee venom components on a new type of modified cellulose. **Toxicon.**, v. 15, p. 447-457, 1977.
- DOTIMAS, E. M. & HIDER. R. C. Honeybee venom. **Bee world**, v. 2, n. 68, p. 51-71, 1987.
- EINARSSON, R. & MORBERG, U. Isotachoforetic characterization of stinging insect venoms. **Chromatography**, v. 13, p. 585-588, 1981.
- FERREIRA, D. B.; COSTA, R. S.; OLIVEIRA, J. A. M. D. & MUCCILLO, G. An infarct-like myocardial lesion experimentally induced in Wistar rats with Africanized bee venom. **J. Pathol.** v. 177, n. 1, p. 95-102, 1995.
- FLOWERS, H. H. Effects of X-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* (cottonmouth moccasin) venom. **Toxicon**, v. 3, p. 301-304, 1966.
- FRANÇA, F. O. S., BENVENUT, L. A., FAN- H. W., DOSSANTOS, D. R., HAIN, S. H., PICCHIMARTINS, F. R., CARDOSO. J. L. C., RAMIGUTLAS, THEAKSTON, R. D. G & WARRELL, D. A. Severe in fatal mass attacks by "killer' bees ( africanized honeybees- *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopatological studies with measurement of serum venom concentration. **Q. J. Med.** v, 87, n° 5, p. 269-282, 1994.
- GAITONDE, B.B., KANKONKAR, S.R. Preparation of cobra (*Naja naja*) venom toxoid using gamma-radiations. Part I. **Bull. Haffkine Inst.**, v.32, p.111-13, 1975.
- GANDOLFO, G, LAMBEAU, G., LAZDUNSKI, M. & GOTTESMANN, C. Effects on behaviour and EEG of single chain phospholipases A<sub>2</sub> from snake and bee venoms injected into rat brain: search for function antagonism. **Pharmacology & Toxicology**, v. 78, n. 5, p. 341-347, 1996.
- GARRISON , W. M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. **Chem. Res.**, v. 87, p. 381-398, 1987.

- GELLERT, A. G. Snake-venom and insect-venom extractors: an unproved therapy. **New Engl. J. Med.**, p. 1322, 1992.
- 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, n. 4, p. 481-492, 1981.
- GOUCHER, C. R. & FLOWERS, H. H. The chemical modification of neurogenic and proteolytic activities of venom and the use of EDTA to produce *Agkistrodon piscivorus*, a venom toxoid. **Toxicon**, v. 2, p. 139-145, 1964.
- GROSCH, D. S. & HOPWOOD, L. E. Biological Effects of Radiations - Ch.2 Direct and indirect action on living matter. p. 17-28. 2nd. ed. Academic Press, New York, 1979.
- GUARNIERI-CRUZ, M.C., MURATA, Y., SOUZA Fo, et al. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. **Toxicon**, v. 28, p. 92, 1990.
- GUIDOLIN, R. DIAS-DA-SILVA, W. HIGASHI, H. G.; CARICATI, C. P.; LIMA, M. L. S. R.; MORAIS M J. F.; PINTO, J. R. & MARCELINO, J. R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. **Men. Inst. Butantan**. v. 51, p. 85-90, 1989.
- HABERMANN, E. Bee and Wasp Venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science**, v. 177, p. 314-322, 1972.
- HATI, A. K.; HATI, R. N.; MANDAL, M.; PANDA, D.; & DAS, S. The effect of Gamma irradiated detoxified viper venom as a toxoid against viper venom. **The Snake**, v. 21, p. 36-40, 1989.
- HENEINE, I. F.; HENEINE, L. G. D.; DANIEL, J. P.; NASCIMENTO, M. C. S. & ROCHA, O. A. Proprieties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination. **An. Acad. Cienc. Est. S. Paulo**, v.57II, p. 55-66, 1988.
- HENEINE, L. G. D.; CARDOSO, V. N.; DANIEL, J. P. & HENEINE, I. F. Detoxification of T<sub>2</sub> fraction from a scorpion (*Titius serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic proprieties of the derivatives. **Toxicon**, v. 24, p. 501-505, 1986.

- HERRERA, E. YARLEQUE, A. CAMPOS, S. & ZAVALETA, A. Gamma irradiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. **Inf. Nucl.**, v. 3.; p. 1-14, 1986.
- HIGASHI, H. G.; GUIDDIN, R. NISHIKAWA, A. K.; YAMAGUCHI, I. K.; LIMA, M. L. S. R.; MORAIS, J. F. & DIAS-DA-SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de protease e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. **Men. Inst. Butantan**. v. 51, p. 107-115, 1989.
- KANKONKAR, S. R.; KANKONKAR, R. C.; GAITONDE, B. B. & JOSHI, S. V. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical applications. In: Radiosterilization of Medical Products. **Int. Atom. Energy Agency**, 1975.
- KING, T. P.; WADE, D.; COSCIA, M. R.; MITCHELL, S.; KOCHOUMIAN, L. MERRIFIELD, B. Structure-immunogenicity relationship of melittin, its transposed analogue, and D-Melittin. **J. Immunol.**, v. 153, n. 3, p. 1124-1131, 1994.
- KOCHOLATY, W. F. GOETZ, C. S.; ASHLEY, B. D.; BILLINGS, T. A. & LEDFORD, E. B. Immunogenic response of the venoms of Fer-de-Lance, *Bothrops atrox asper*, la Cascabella, *Crotalus durissus durissus*, following photooxidative detoxification. **Toxicon**, v. 5, p. 153-158, 1968.
- LALLEMENT, G.; FOSBRAEY, P. BAILLE, LE CROM, V.; TATTERSALL, J. E. H.; BLANCHET, G.; WETHERELL, J. R.; RICE, P.; PASSINGHAM, S. L. & SENTENAC-ROUMANOU, H. Compared toxicity of the potassium channel blockers, apamin and dendrotoxin. **Toxicology**, v. 104, n. 1-3, p. 47-52, 1995.
- LOSANO, R. M.; YEE, B. C.; BUCHANAN, B. B. Thioredoxin-linked reductive inactivation of venom neurotoxins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 309, n. 2, p. 356-362, 1994.
- MANZOLI-PALMA, M. F. & PALMA, M. S. P. Aspectos entológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **Revista do SBAI**, v.15, p.123-125, 1992.
- MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. **Anal. Chem.**, v.31, p.1-6, 1959.

- MOORE, B. D.; KANDEKARO, M.; GARY, H. E. J. R. & EISENBERG, H. M. Electrophysiological evidence of the neurotoxic effects of apamina on auditory function in the rat. **Neurosc. Letters**, v. 91, n. 3, p. 247-252, 1988.
- MOROZ, C.; GOLDBLUM, N. & de VRIES, A. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethylcellulose bound neurotoxin as antigen. **Nature**, v. 200, p. 697-698, 1963.
- MOUSLI, M., BRONNER, C., BUEB, J. L. & LANDRY, Y. Evidence for the interaction of mast cell-degranulating peptide with pertussis toxin-sensitive G protein in mast cells. **Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Section**, v. 5, n. 3, p. 249-255, 1991.
- MÜLLER, U., MOSBECH, H. & BLAAUW, P. et al. Emergency treatment of allergic reactions to Hymenoptera stings. **Clin. Exp. Allergy**, v. 21, p. 281-288, 1991.
- MURATA, Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***. São Paulo, 1988. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).
- MURATA, Y; NISHIKAWA, A. K.; NASCIMENTO, N. HIGASHI, H. G.; SILVA, W.D. & ROGERO, J. R. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. In: International Society on Toxinology PanAmerican Section III Symposium on Animal, Plant and Microbial toxins. Mexico, 9-12 January 1990 p.93, 1990,.
- NASCIMENTO, N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada -Aspectos bioquímicos e farmacológicos**. São Paulo, 1991. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).
- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C. S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J. R. & KAISER, I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: bioquimical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 123-131, 1996.
- NASCIMENTO, N., SPENCER, P.J., ANDRADE JR, H.F., et al. Effects of gamma radiation on snake venoms. **Radiat. Phys. Chem.** v.52, p.665-69, 1998.

- OWEN, M. D. & SLOLEY, B. D. 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L.): Variation with season and with insect age. **Toxicon**, v. 26, n. 6, p. 577-582, 1988.
- OWNBY, C. L., POWELL, J. R., JIANG, M.S. & FLETCHER, J. E. Mellitin and phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom. **Toxicon**, v. 35, n.1, p. 67-80, 1997.
- PECK, M. L.; O'CONNOR, R.; JOHNSON, T. J.; ISBELL, A. F.; MARTELL, A. E.; McLENDEN, G.; NEFF, R. D. & WRIGHT, D. A. Radioprotective potential and related proprieties of glycyhistamine, an analogue of histamine terminal peptides found in bee venoms. **Toxicon**, v. 16, p. 690, 1978.
- PURANANDA, C. Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization - Vienna, **Int. Atom. Energy Agency**, 1972.
- QUISTAD, G. B., SKINNER, W. S. & SCHOOLEY, A. Venoms of social Hymenoptera-Toxicity to the Lepidopteran, *Manduca sexta*. **Insect Biochem.**, v. 18, n. 6, p. 511-514, 1988.
- RÄDER, K.; WILDFEUER, R. WINTERBERGER, F.; BOSSINGER, P.; & MÜCKE, H-W. Characterization of bee venom and its main components by high performance liquid chromatography. **J. Chromatography**, 408 p.341-8, 1987.
- REHM, H.; BIDARD, J. N.; SCHWEITZ, H. & LAZDUNSKI, M. The receptor site for the bee venom mast cell degranulating peptide: Affinity labeling and evidence for a commom molecular target for mast cell degranulating peptide and dendrotoxin I, a snake toxin active on potassium channels. **Biochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1827-1832, 1988.
- REISMAN, R. E. Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 89, n. 2, p. 529-535, 1992.
- RICHARDS, O. W. & DAVIES, R.G. Tratado de Entomologia Imms: Classification y Biologia, v. 2, 988pp., Ed. Omega S.A., Barcelona, Espanha, 1984.

- ROGERO, J. R.; **Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica hidrogênio-trício** São Paulo, 1978. Tese de doutoramento - Instituto de Química (USP).
- ROGERO, J. R. & NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. **J. Venom. Anim. Toxin.** v. 1, n. 1 p. 7-10, 1995.
- ROGERO, J.R. & NASCIMENTO, N. Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento.** v.2, p.24-6, 1997.
- SAHA, G.B. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabelling. In: SAHA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy.** New York, N.Y.: Springer-Verlag, 3 ed., 1992, p. 80-107.
- SAWAI, Y. Vaccination against snake bite poisoning. In: Snake venoms, Ed. C. Y. LEE, Berlim, Springer-Verlag, v. 52, ch. 23, p. 881-897, 1979.
- SCHÄGGER, H. & von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v.166, p.368-79, 1987.
- SCHMIDT, J. O. Allergy to Hymenoptera venoms In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects.** London Academic Press, p. 509-546, 1986.
- SCHMIDT, J. O. Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. **Toxicon**, v. 33, n.7, p.917-927, 1995.
- SCHMIDT, J. O., BLUM, M. S. The biochemical constituents of the venom of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius* . **Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol.**, v. 61, p. 239-247, 1978.
- SCHUMACHER, M. J, SCHMIDT, J.O., EGEN, N. B. & LOWRY, J. E. Quantity, analysis, and lethality of european and africanized honey bee venoms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 43,n,1, p. 79-86, 1990.

- SCHUMACHER, M. J.; TVETEN, M. S. & EGEN, N. B. Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 93, n.5, p. 831-835, 1994.
- SHIPMAN, W. H. & COLE, L. J. Increased resistance of mice to X-irradiation after the injection of bee venom. **Nature** (London), v. 215, p. 311-312, 1967.
- SHKENDEROV, S. Anaphylactogenic properties of bee venom and its fractions. **Toxicon.**, v. 12, p. 529-534, 1974.
- SMITH, E. L., HILL, R. L., LEHMAN, I. R., LEFKOWITZ, R. J., HANDLER, P. & WHITE, A. Metabolismo dos aminoácidos III. In: -----**Bioquímica: Aspectos Gerais**, 7ª . Guanabara Koogan, p. 587-589, 1985.
- SOUZA-FILHO, J. N. **Efeitos da radiação ionizante na crotoxina (toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*): Estudos ao nível molecular.** São Paulo, 1988. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).
- 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, 103-113, 1992.
- SPENCER, P.J. **Efeitos da radiação na estrutura molecular da bothropstoxina-1** São Paulo: IPEN, 2000. 86p. Tese (Doutorado Ciências- Área de Tecnologia Nuclear) - IPEN, Universidade de São Paulo, 2000.
- STRAIGHT, R. C. & GLENN, J. L. Human fatalities caused by venomous animals in Utah, 1900-90. **Great Basin Naturalist**, v. 53, n. 4, p. 390-394, 1993.
- TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A. The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and the antigenic activities of snake venom. **Toxicon**, v. 8, p. 225-233, 1970.
- VAZ, N.M., AND B.B. LEVINE.. Immune responsiveness of mice to low doses of antigen. Relationship to histocompatibility (H-2) type. **Science**, v. 168 p. 852-856, 1970a.

- VAZ, N.M., C.M. SOUZA, AND L.C.S. MAIA.. Genetic control of immune responsiveness in mice. Responsiveness to ovalbumin in (C57BL/6xDBA/2)F1 mice. **Int.Arch.Allergy**, v. 46, p. 275-282, 1974.
- VAZ, N.M., E.M. VAZ, AND B.B. LEVINE.. Relationship between H-2 genotype and immune responsiveness to low doses of ovalbumin in the mouse. **J. Immunol.**, v. 104, p. 1572-1578, 1970b.
- VICK, J. A.; SHIPMAN, W. H. & BROOKS, R. B. Beta-adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardiopep, a newly isolated substance from bee venom. **Toxicon**, v.12, p.139-144, 1974.
- WEBER A.; SCHRODER H., THALBERG K.; MARZ L. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. **Allergy**, v. 42, p. 464-70. 1987.
- WHO. Progress in Characterization of Venoms and Standardization of antivenos, WHO offset Publication n. 58, Geneva, 1981.
- YU, Y.; DEWECK, A. L.; STADLER, B. M. & MÜLLER, U. Anti-IgE autoantibodies and bee-sting allergy. **Allergy**, v. 50, n. 2, p. 119-125, 1995.