

ESTUDO DOS AGREGADOS GERADOS DURANTE A IRRADIAÇÃO DO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* (Cdt) COM RAIOS GAMA.

Patricia Bianca Clissa*, Nanci do Nascimento* & José Roberto Rogero*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil

RESUMO

Doses de 2,0 kGy de radiação gama reduz a toxicidade do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) sem alterar sua capacidade imunogênica. Quando a crotoxina, principal toxina deste veneno, foi irradiada com a mesma dose, também verificou-se a atenuação de sua toxicidade e manutenção da imunogenicidade, este fato foi atribuído aos agregados (compostos de alto peso molecular gerados durante a irradiação). Com o objetivo de identificar uma dose de radiação gama para o veneno de Cdt que fosse capaz de gerar grandes quantidades de agregados atóxicos, porém imunogênicos, amostras de veneno foram irradiadas nas doses de 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy e submetidas ao fracionamento. Após serem isolados, os produtos gerados pela irradiação (agregados e frações não agregadas) foram avaliados quanto às alterações moleculares, atividade tóxica, atividade imunogênica e capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos. Os resultados obtidos foram comparados ao veneno não irradiado, confirmando ser a dose de 2,0 kGy a mais eficiente na associação da atenuação da toxicidade e manutenção da imunogenicidade deste veneno, enquanto as demais doses, apesar de mostrarem-se eficientes na formação de grandes quantidades de agregados atóxicos, foram ineficientes na manutenção da atividade imunogênica. Assim, ficou caracterizado que a dose de 2,0 kGy pode ser utilizada com sucesso para destoxicar venenos a serem utilizados no processo de imunização de animais, visando aprimorar a produção de soros.

I. INTRODUÇÃO

Existem cerca de 40 espécies de serpentes venenosas no território brasileiro, que estão divididas em quatro gêneros distintos: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* [1]. De um modo geral, estas serpentes estão distribuídas por todo o país e são responsáveis anualmente por 15,5 acidentes por 100.000 habitantes [2].

Entre os quatro gêneros responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil, as serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus* se destacam das demais por causarem os acidentes com maior índice de letalidade, representando o envenenamento ofídico mais grave em nosso meio.

A subespécie crotálica mais estudada e mais freqüente é a *Crotalus durissus terrificus*. O veneno desta serpente é rico em enzimas e peptídeos biologicamente ativos. Entre as principais toxinas encontram-se: convulsina, giroxina, crotoxina e crotamina, sendo a crotoxina, a toxina mais letal presente neste veneno [3].

As complicações mais graves do acidente crotálico, que podem resultar em morte, são a insuficiência renal aguda e mais raramente a insuficiência respiratória aguda. Estas costumam ocorrer naqueles pacientes tratados tardiamente ou que receberam o tratamento inadequado [4].

O tratamento mais adequado e mais utilizado atualmente em envenenamentos ofídicos é a soroterapia. Este consiste na administração intravenosa de soro antiofídico, obtido a partir do plasma sanguíneo de animais soroprodutores, imunizados com venenos de serpentes.

A produção de soro antiofídico depende da imunogenicidade de cada veneno, os venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus*, por sua vez, não são considerados bons imunógenos [5].

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

Uma das técnicas que vem sendo utilizada com bastante sucesso para destoxicar venenos é a técnica de atenuação por radiação ionizante [6].

A irradiação de proteínas no estado seco ou em solução leva a alterações químicas, físico-químicas e estruturais bastante significativas. Estas mudanças resultam em uma diminuição e inativação de algumas

atividades biológicas destas proteínas, tais como atividade tóxica, enzimática e imunológica [7].

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

Devido ao fato de os venenos de serpentes serem constituídos por misturas complexas de proteínas e outros componentes, durante a irradiação pode ocorrer uma proteção mútua dos compostos em solução, diminuindo consideravelmente os efeitos da radiação sobre seus componentes. Logo, o estudo de toxinas ou proteínas isoladas, objetivando elucidar a ação dos raios gama na detoxicação de venenos, apresenta vantagens sobre o estudo do veneno total. Assim a crotóxina, por corresponder a cerca de 60% do peso seco do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e ser a sua toxina mais letal, foi estudada por NASCIMENTO [9],[10] no sentido de elucidar os efeitos da radiação gama sobre o veneno crotálico.

NASCIMENTO [9] irradiou a crotóxina em solução ácida e observou uma manutenção em sua solubilidade. Esta proteína irradiada manteve suas propriedades antigênicas e imunogênicas preservadas e sua toxicidade diminuída. Em um estudo mais detalhado sobre os principais produtos gerados pela irradiação da crotóxina, NASCIMENTO et al. [10] observaram a formação de complexos solúveis de alto peso molecular, passíveis de separação em cromatografia de exclusão molecular, os quais foram denominados "agregados". Os agregados mostraram-se cerca de 40 vezes menos tóxicos do que a crotóxina nativa e ainda mantiveram-se capazes de induzir a formação de anticorpos eficientes no reconhecimento e neutralização da crotóxina.

Diante dos resultados de NASCIMENTO et al. [10], de que os agregados são os responsáveis pela detoxicação da crotóxina, sendo praticamente atóxicos, mas mantendo intactas suas propriedades imunogênicas e antigênicas e do fato de que a quantidade de agregados gerada pela irradiação é dose-dependente, aventou-se a hipótese de que a obtenção de altas concentrações de agregados seria uma alternativa eficiente na produção de

um imunógeno ideal para o processo de soroprodução. A obtenção de agregados atóxicos e imunogênicos a partir do veneno total irradiado apresentaria a vantagem de eliminar o procedimento de purificação da crotóxina, além de estarem presentes os demais componentes do veneno crotálico durante a produção do anti-soro.

Assim o objetivo deste trabalho foi irradiar o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* com as doses de 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy; estabelecer uma dose de radiação capaz de gerar altas concentrações de agregados atóxicos e imunogênicos; e avaliar a eficiência dos anticorpos produzidos quanto à capacidade de neutralizar a atividade tóxica do veneno crotálico nativo.

II. MÉTODOS

Irradiação do veneno. O veneno crotálico na forma liofilizada foi solubilizado em solução de cloreto de sódio 0,15 M a uma concentração de 2,0 mg/ml e irradiado com doses de 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy em uma fonte de ^{60}Co (Gamma Cell 220, Atomic Energy Agency of Canada), disponível no Departamento de Aplicações de Técnicas Nucleares do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN-SP. A taxa de dose utilizada foi de 350 Gy/h. A irradiação das amostras ocorreu sempre na presença de oxigênio, a temperatura ambiente e de forma homogênea e ininterrupta.

Quantificação dos produtos da irradiação. Após as irradiações as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, durante 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante teve sua concentração protéica dosada pelo método de BRADFORD [11]. Foi feito um cálculo da quantidade média de proteína precipitada em cada dose de irradiação pela diferença entre a concentração protéica da solução antes de sofrer a irradiação (concentração inicial) e a concentração protéica das amostras irradiadas e centrifugadas (concentração final). Os experimentos de cada dose foram realizados em triplicata para o cálculo da média e desvio padrão.

Isolamento dos agregados e das frações irradiadas não agregadas. As amostras irradiadas foram submetidas, separadamente, ao procedimento de fracionamento por exclusão molecular em coluna XK 16/100 (2,5x90cm), equilibrada com tampão formiato de amônio 0,1 M, pH 3,0, com um fluxo constante de 0,22 ml/min. Estimou-se então a área referente aos agregados solúveis formados em cada dose e às frações irradiadas não agregadas, por meio da integração das densidades ópticas (D.O.).

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

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

Para o cálculo das quantidades a serem injetadas utilizou-se o protocolo descrito por AIRD & KAISER [12], e no cálculo de DL_{50} utilizou-se o método de Spearman-

Karber, conforme recomendado pela Organização Mundial de Saúde [13].

Atividade imunogênica dos agregados e não agregados. A capacidade das frações irradiadas, isoladas por cromatografia, induzirem uma resposta imunológica foi pesquisada em camundongos, utilizando-se o procedimento clássico de imunização.

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

Os animais foram sangrados semanalmente a partir do segundo inóculo pelo plexo orbital e a titulação seriada dos anticorpos séricos obtidos contra os agregados solúveis, os não agregados e o veneno nativo foi realizada através de um procedimento de Ensaio Imunoenzimático de Ligação (ELISA) conforme descrito por Nascimento [10].

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

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Quantificação dos produtos da irradiação. Durante a irradiação ocorreu a precipitação de quantidades crescentes de proteínas, conforme o aumento da dose de irradiação. Com 2,0; 3,0 e 5,0 kGy houve a precipitação de aproximadamente 11%, 17% e 31% das proteínas. Já a dose de 10,0 kGy foi responsável por uma precipitação praticamente total (aproximadamente 95% das proteínas em solução). A tabela 1 expressa a porcentagem de precipitados formados durante a irradiação e a concentração protéica do sobrenadante das amostras nativa e irradiadas.

TABELA 1. Quantificação dos precipitados.

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

Isolamento dos agregados e das frações irradiadas não agregadas. O perfil cromatográfico do veneno nativo (figura 1) mostra a presença dos quatro principais componentes do veneno crotálico: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina.

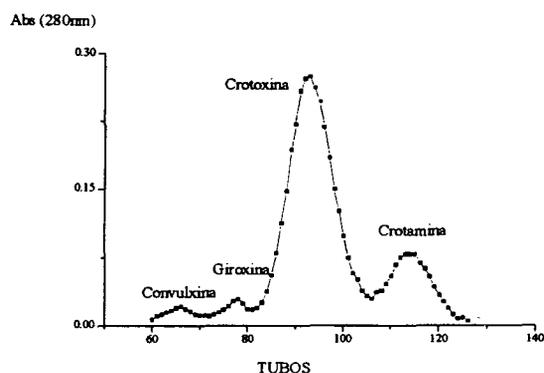


Figura 1: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus*

O veneno que recebeu a dose de 2,0 kGy de irradiação apresentou a formação de compostos de alto peso molecular eluindo na posição do volume de exclusão (Vo) (figura 2). Estes compostos de alto peso molecular, somados aos de peso molecular variado que eluíram até o tubo 80 foram reunidos e denominados de agregados solúveis do veneno irradiado com 2,0 kGy (ASVI 2,0 kGy); estes agregados representaram aproximadamente 51% do total das proteínas precipitadas (tabela 2). Observamos ainda a manutenção de compostos correspondentes à crotoxina, entre os tubos 80 e 100 e à crotamina, entre os tubos 100 e 120. Estes foram reunidos e denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 2,0 kGy (FNAVI 2,0 kGy); esta fração representou cerca de 49% das proteínas em solução (tabela 2).

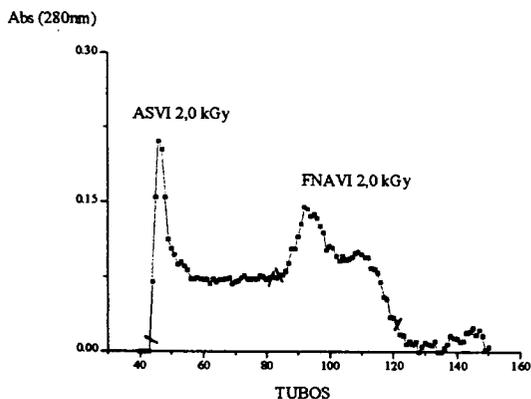


Figura 2: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 2,0 kGy.

Nas amostras de veneno crotálico irradiadas com 3,0 kGy (figura 3) também ocorreu a formação de compostos de alto e variado peso molecular (do tubo 43 ao 80), denominados de agregados solúveis do veneno irradiado com 3,0 kGy e, embora com uma absorbância consideravelmente mais baixa quando comparada ao veneno nativo, houve uma relativa manutenção dos compostos correspondentes à crotóxina e crotamina (entre os tubos 80 e 117), denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 3,0 kGy; estas frações correspondem respectivamente a 61% e 39% do total das proteínas presentes em solução após a irradiação (estimada pela integração total das densidades ópticas de cada tubo - (tabela 2).

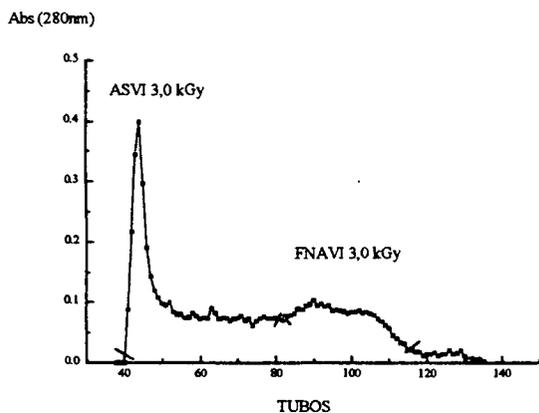


Figura 3: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 3,0 kGy

Com a dose de 5,0 kGy (figura 4) houve a formação praticamente exclusiva dos agregados de alto e variado peso molecular, reunidos até o tubo 80 e denominados de agregados solúveis do veneno irradiado

com 5,0 kGy. Não foi observada a manutenção dos compostos correspondentes à crotóxina e crotamina, mas ainda assim os tubos referentes a estas frações foram reunidos e denominados de fração não agregada do veneno irradiado com 5,0 kGy para posterior ensaio das atividades tóxica e imunogênica; estas frações corresponderam respectivamente a 88% e 12% do total das proteínas presentes em solução após a irradiação, conforme pode ser observado na tabela 2.

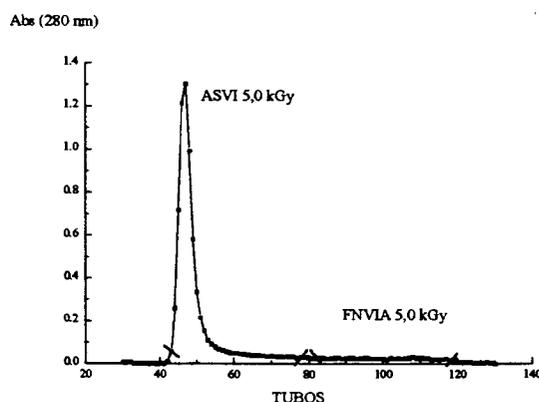


Figura 4: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 5,0 kGy.

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

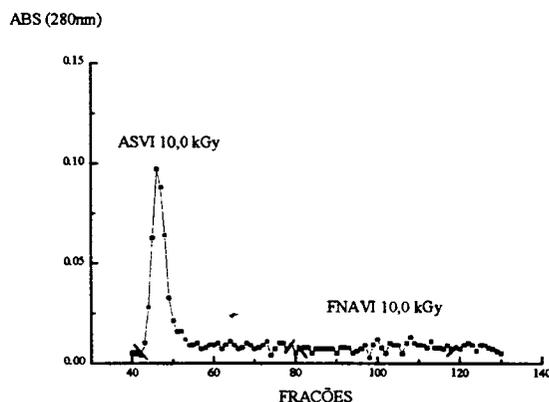


Figura 5: Perfil cromatográfico de veneno de *C. d. terrificus* irradiado com 10,0 kGy.

TABELA 2: Estimativa das áreas relativas às frações agregadas e não agregadas.

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

ASVI = Agregados solúveis do veneno irradiado;
 FNAVI = Fração não agregada do veneno irradiado.
 * Média (\pm desvio padrão)

Atividade Tóxica. Os agregados e as frações não agregadas apresentaram a toxicidade atenuada à medida que a dose de irradiação aumentou. Na tabela 3 podemos observar os resultados de DL₅₀.

TABELA 3: Atividades tóxicas dos venenos nativo, irradiado e frações isoladas.

Amostras	DL ₅₀ (µg/g)	Toxicidade relativa
Veneno Nativo	0,148 (0,258 - 0,085)	1,0
ASVI 2,0 kGy	2,38 (6,9 - 0,8)	15,8
ASVI 3,0 kGy	2,71 (3,41 - 2,14)	18,3
ASVI 5,0 kGy	6,72 (11,7 - 3,8)	45,4
FNAVI 2,0 kGy	0,53 (0,4 - 1,4)	3,5
FNAVI 3,0 kGy	>0,8	>5,4
FNAVI 5,0 kGy	>0,8	>5,4

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

Atividade imunogênica dos agregados e não agregados. O acompanhamento da produção de anticorpos nos 7 grupos imunizados pode ser observado na figura 6, onde observamos que o veneno nativo, os agregados e os não agregados produzidos com 2,0 kGy comportaram-se de maneira similar durante a imunização, apresentando estes últimos, a manutenção da capacidade de induzir a formação de anticorpos que reconhecem o veneno nativo. Já os agregados e não agregados do veneno irradiado com 3,0 e 5,0 kGy apresentaram baixos títulos de anticorpos capazes de reconhecer o veneno nativo de *C. d. terrificus*.

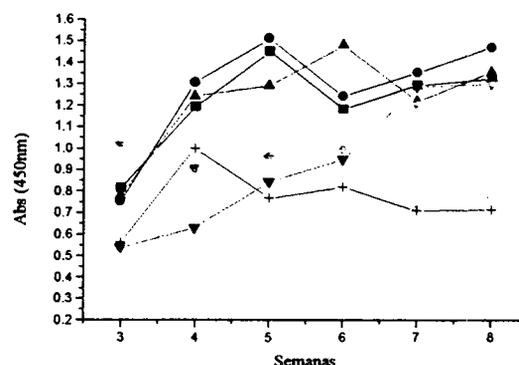


Figura 6 Produção de anticorpos capazes de reconhecer o veneno crotálico nativo em camundongos imunizados com os seguintes antígenos: (■) Veneno total nativo; (●) ASVI com 2,0 kGy; (▲) FNAVI de 2,0 kGy; (□) ASVI com 3,0 kGy; (○) FNAVI com 3,0 kGy; (△) ASVI com 5,0 kGy; (◇) FNAVI com 5,0 kGy. Diluição do soro: 1/800.

Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados e antifração não agregada. Os resultados da neutralização podem ser vistos na tabela 4, que expressa a porcentagem de camundongos, por grupo, sobreviventes ao desafio de 5 DL₅₀ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e o título do “pool” dos soros de cada grupo.

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

TABELA 4: Capacidade neutralizante “in vivo” dos anticorpos antiagregados, antifração não agregada e antiveneno nativo.

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

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

V. CONCLUSÕES

1. Entre todas as doses de irradiação utilizadas, a quantidade de agregados solúveis produzida foi maior com a de 5,0 kGy. Embora estes compostos apresentem-se 45 vezes menos tóxicos que o veneno nativo, eles não são eficientes em induzir da formação de anticorpos capazes de neutralizar a ação tóxica do veneno.
2. As doses de 5,0 e 10,0 kGy promovem atenuação praticamente total da toxicidade do veneno, causando também diminuição considerável de sua capacidade imunogênica.
3. Os agregados produzidos com a dose de 2,0 kGy apresentam-se 15 vezes menos tóxicos que o veneno nativo e tão eficientes quanto estes na capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes.

REFERÊNCIAS

- [1] CARDOSO, J.L.C. **Acidentes por animais peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos - comentários e sugestões.** Brasília, Nov. 1993 (NR:93-1011).
- [2] RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLENAVE, R.N.U.R. **Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos.** Brasília. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. 1989. 37p.
- [3] BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A.M.; DIAS, W.O.; ESTEVES, M.I.; HIRACHI, E.; OISHI, N.Y.; PICARELLI, Z.P.; ROCHA, M.C.; UEDA, C.M.P.M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. **A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom.** Mem. Inst. But., v.49, p.69-78, 1987.
- [4] AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, P. **Acidente Crotálico.** In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos.** São Paulo, Brasil, Sarvier, 1992, p. 161-170.
- [5] SOERENSEN, B. **Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos.** In: SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos - reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos.** Rio de Janeiro/São Paulo, Atheneu, 1990. p.91-107.
- [6] ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. **Detoxification of snake venom using ionizing radiation.** J.Venom. Anim.Toxins, v.1, n.1, p.7-10, 1995.
- [7] SKALKA, M.; ANTONI, F. **Effect of radiation on the biological properties of proteins.** In: RADIATION SENSITIVITY OF TOXINS AND ANIMAL POISONS, May 19-22, 1969, Bangkok. *Proceedings...* Viena: IAEA, 1970. p.1-11.
- [8] BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. **Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems.** Radiat. Phys. Chem. v.24, n.3/4, p.273-282, 1984.
- [9] NASCIMENTO, N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos.** São Paulo: 1991. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- [10] NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. **Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects.** *Toxicon*, v. 34, p.123-131, 1996.
- [11] BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., v.72, p. 248-253, 1976.
- [12] AIRD, S.D. ; KAISER, I.I. **Toxicity assays.** *Toxicon*. v.23, p.11-13, 1985.
- [13] WHO, **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms,** Geneva: 1981 (Publication No. 58).
- [14] GUARNIERI, M.C. **Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*.** São Paulo, 1992. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

ABSTRACT

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