

# OTIMIZAÇÃO DA ATENUAÇÃO DE VENENO CROTÁLICO COM RADIAÇÃO GAMA $^{60}\text{Co}$

Patricia Bianca Clissa; Nanci do Nascimento; Luciana Terumi Nagao & José Roberto Rogero

Coordenadoria de Bioengenharia  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN  
Travessa R, 400 - Cid. Universitária  
05508-900 São Paulo SP - Brasil

## RESUMO

Veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel Sul Americana, foi irradiado em solução, nas doses de 2, 3, 5 e 10kGy em uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , com o objetivo de estabelecer uma dose capaz de destoxicar o veneno, sem destruir suas propriedades imunogênicas. Foi observada ainda a quantidade de agregados formados, uma vez que estes se mostraram importantes durante o processo de destoxicação da crotalina, principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. O perfil da cromatografia de exclusão molecular mostrou que a quantidade destes agregados formados durante a irradiação aumenta de acordo com um aumento da dose de radiação.

O veneno irradiado com a dose de 2kGy apresentou níveis de toxicidade cerca de 3 vezes menores do que o veneno não irradiado, enquanto que o veneno irradiado com 3kGy foi 10 vezes, e o irradiado com 5 e 10kGy foi pelo menos 20 vezes menos tóxico do que o veneno não irradiado. Por outro lado, o veneno irradiado com 2kGy foi o que induziu a formação de anticorpos mais eficientes no reconhecimento e na neutralização do veneno não irradiado, usando-se um esquema clássico de imunização.

## INTRODUÇÃO

Os venenos crotálicos são considerados intrinsecamente fracos imunógenos, e devido à sua alta letalidade não podem ser administradas grandes quantidades em animais soroprodutores [1]. Atualmente existem várias metodologias voltadas para a atenuação da toxicidade de venenos [2-4]. Uma metodologia que vem se mostrando bastante eficiente é a atenuação da toxicidade pela ação direta e indireta da radiação ionizante sobre toxinas em solução [5-12].

Estudos preliminares mostram que uma dose de 2kGy reduz a atividade tóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, mas não altera suas propriedades imunogênicas [5, 6]. Trabalhos mais recentes mostram que a crotalina, principal toxina do veneno crotálico, após receber a mesma dose de radiação, também apresentou sua toxicidade atenuada e suas propriedades imunogênicas preservadas, fato este atribuído à formação de compostos de alto peso molecular, denominados agregados [7].

O objetivo deste estudo é estabelecer uma dose de radiação para o veneno crotálico, capaz de produzir maior quantidade de agregados atóxicos porém imunogênicos.

## PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

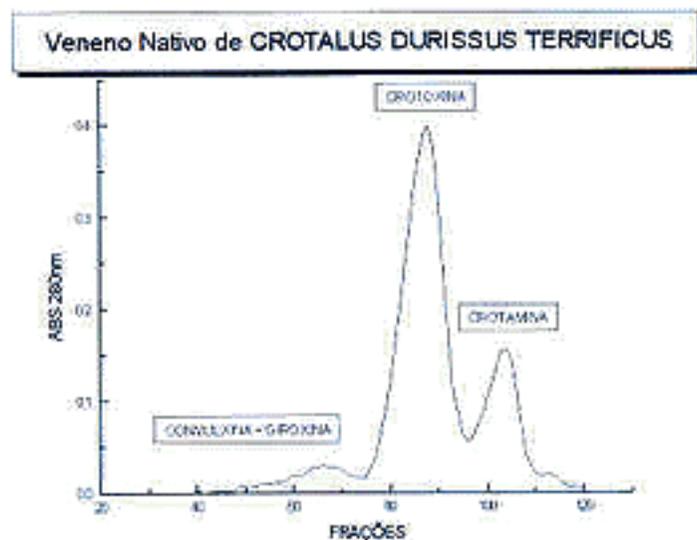
**I. Irradiação de venenos:** Veneno de *Crotalus durissus terrificus* crotamino-positivo, na forma cristalizada, foi ressuspendido em NaCl 150mM e a concentração foi ajustada para 2,0mg/ml pelo método de Bradford [13]. Foram aliqüotadas amostras de 6,0ml em frascos de vidro, e irradiadas em uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Gamma Cell 220, Atomic Energy Agency of Canada) com uma taxa de dose de 0,391kGy/h, ininterruptamente, com as doses de 2, 3, 5 e 10kGy. O processo de irradiação ocorreu com a amostra em pH 3,0 na presença de  $\text{O}_2$  e a temperatura ambiente. Uma amostra nas mesmas condições foi deixada do lado de fora da fonte como controle.

Após a irradiação observou-se a formação de compostos insolúveis, evidenciados através da precipitação. Estes compostos foram chamados de agregados insolúveis. As amostras foram guardadas imediatamente após serem irradiadas, em congelador (-20°C), até o momento da sua utilização.

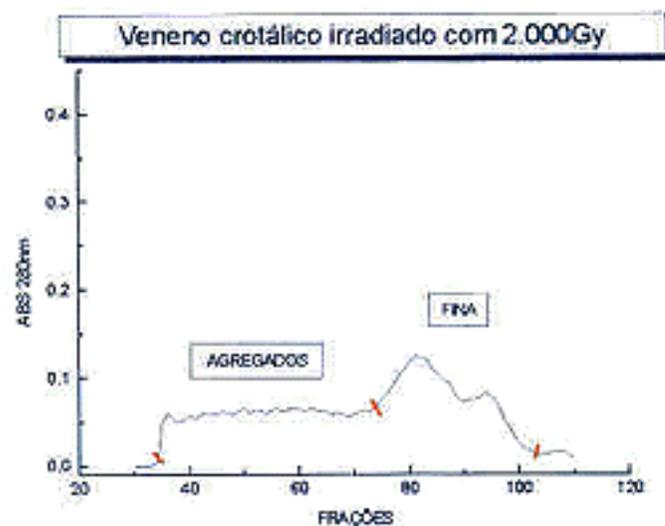
**II. Isolamento dos agregados:** O veneno irradiado foi centrifugado com 8.000g durante 10 min., a 4°C. As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Bradford [13], à fim de se estimar a quantidade de proteína precipitada, de agregados insolúveis (tabela 1). As proteínas solúveis foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 (71 X 2,5cm), eluindo com ácido acético 100mM, pH 3,0 a um fluxo constante de 18ml/h. Frações de 3,0 ml foram coletadas em um coletor LKB-Pharmacia. As frações referentes aos agregados foram separadas, congeladas e liofilizadas. Foram realizadas também cromatografias do veneno nativo, sob as mesmas condições (figuras 1, 2, 3 e 4).

**Tabela 1:** Concentração protéica do sobrenadante das amostras irradiadas e centrifugadas, e estimativa da porcentagem de agregados insolúveis:

Dose de Radiação (kGy)	Concentração (mg/ml)	% de agregados insolúveis
0	1,93	0
2	1,88	2,5
3	1,81	5,7
5	1,85	3,7
10	0,12	93,7



**Figura 1:** 6,0ml de uma solução à 1,93mg/ml de veneno nativo aplicada em coluna Sephadex G-100 (71 X 2,5cm). Eluente: ác. acético 100mM. Fluxo: 18ml/h. Volume coletado por fração: 3,0ml.



**Figura 2:** 6,0ml de uma solução à 1,88mg/ml de veneno irradiado com 2.000Gy aplicada em coluna Sephadex G-100 (71 X 2,5cm). Eluente ác. acético 100mM. Fluxo: 18ml/h. Volume coletado por fração: 3,0ml.



**Figura 3:** 6,0ml de uma solução à 1,81mg/ml de veneno irradiado com 3.000Gy aplicada em coluna Sephadex G-100 (71 X 2,5cm). Eluente ác. acético 100mM. Fluxo: 18ml/h. Volume coletado por fração: 3,0ml.



**Figura 4:** 6,0ml de uma solução à 1,85mg/ml de veneno irradiado com 5.000Gy aplicada em coluna Sephadex G-100 (71 X 2,5cm). Eluente: ác. acético 100mM. Fluxo: 18ml/h. Volume coletado por fração: 3,0ml.

**III. Atividade Tóxica:** A dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) para o veneno nativo e para as frações irradiadas foi calculada segundo Spearman-Kärber [14]. Foram usados 4 grupos de 4 camundongos machos pesando entre 22 e 28g. A menor concentração da solução utilizada foi  $0,0031\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , com um fator de diluição de 2,0. A mortalidade dos animais foi acompanhada por 48hs. A determinação da  $DL_{50}$  foi feita utilizando-se o método citado acima, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 2.

**Tabela 2:** Atividade letal das frações irradiadas com as diferentes doses.

Amostra*	Dose ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Nº de $DL_{50}$
VTN	0,148 (258,34-85,46)	1
AgS 2kGy	2,18	15
AgS 3kGy	>2,5	>17
AgS 5kGy	>2,5	>17
AgS 10kGy	ND	ND
FINA 2kGy	0,37	2,5
FINA 3kGy	0,88	5
FINA 5kGy	>1,03	>7
FINA 10kGy	ND	ND
VTI 2kGy	0,44	3
VTI 3kGy	1,88	12
VTI 5kGy	2,2	15
VTI 10kGy	>7,4	>50

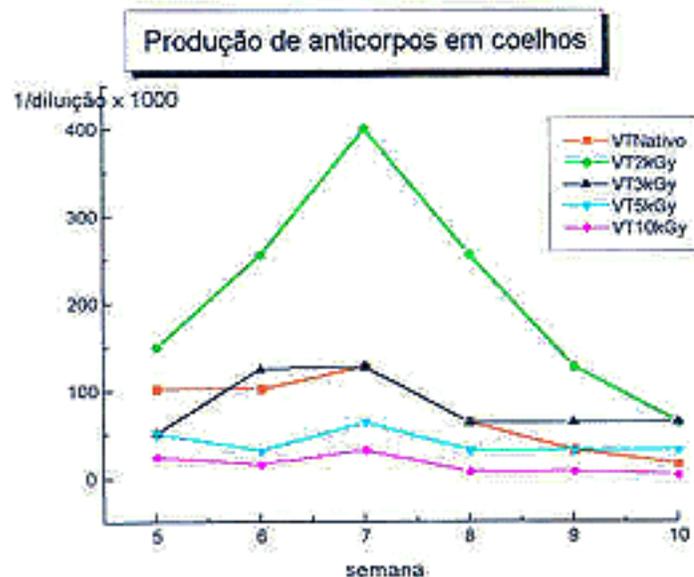
\* VTN = Veneno Total Nativo, AgS = Agregados Solúveis; FINA = Fração Irradiada Não Agregada; VTI = Veneno Total Irradiado; ND = Não Determinado

**IV. Imunização de Coelhos:** Foram imunizados coelhos fêmeas, pesando entre 3 e 4 kg, com colheita prévia de soro para controle. O veneno crotálico nativo e o veneno irradiado com as doses de 2, 3, 5 e 10kGy foram utilizados como antígeno, sendo diluídas em NaCl 150mM (quando necessário) e emulsificadas com igual volume de adjuvante de Freund completo, de modo que foram injetadas 0,296mg de veneno nativo, e 2,072mg de veneno irradiado. Estas quantidades foram injetadas em um volume final de 2,6ml, em 4 locais diferentes do dorso do coelho pela via intradérmica.

Após 15 dias foi feito outro inóculo seguindo o mesmo procedimento citado acima, diferindo apenas o adjuvante utilizado, sendo utilizado Hidróxido de Alumínio. Foram feitos outros 2 inóculos, seguindo um intervalo de 15 dias entre cada, com as amostras diluídas apenas em NaCl 150mM e inoculadas pela via subcutânea.

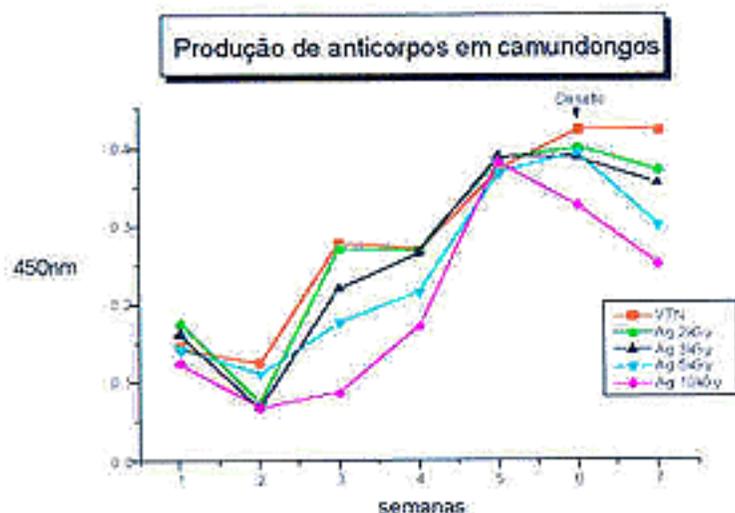
Foram feitas sangrias semanais, à partir da 5ª semana, pela veia marginal da orelha do coelho. O sangue foi centrifugado e o soro separado para posterior titulação.

O veneno nativo e irradiado com as doses de 2, 3, 5 e 10 kGy induziram a formação de anticorpos em coelhos, e todos reconheceram o veneno nativo quando testados através de um ensaio imunoenzimático - ELISA - (figura 5). A titulação destes anticorpos mostrou uma grande diferença na produção de anticorpos induzidos pelo veneno irradiado com 2kGy, quando comparada com as demais doses e com o veneno nativo.



**Figura 5:** Produção de anticorpos induzidos por veneno crotálico nativo e irradiado nas diversas doses.

**V. Imunização de Camundongos:** Grupos de 10 camundongos machos pesando entre 28 e 35 g receberam os seguintes imunógenos: Agregados solúveis do veneno irradiado com 2, 3, 5 e 10kGy e veneno nativo. Cada animal recebeu 0,007mg dos imunógenos por inóculo, pela via intradérmica, no dorso, em 4 locais diferentes. Foi realizado 1 inóculo semanalmente durante 6 semanas, sendo o 1º inóculo com 50% de adjuvante de Freund completo, e os demais com 50% de Hidróxido de Alumínio. Os animais foram sangrados semanalmente pelo plexo orbital, o soros foram separados e reservados para posterior titulação (figura 6), por um ensaio imunoenzimático (ELISA). Na 6ª semana, a fim de verificar a capacidade neutralizante "in vivo" dos anticorpos, os animais foram desafiados com 5 e 10  $DL_{50}$  do veneno nativo diluído em PBS, e observados durante 48hs (tabela 3).



**Figura 6:** Produção de anticorpos induzidos por agregados solúveis das diversas doses e por veneno total nativo (diluição do soro: 1/200).

**Tabela 3:** Porcentagem dos sobreviventes ao desafio de 5 ou 10 DL<sub>50</sub>, e título de anticorpos séricos ( $\tau$ ).

Amostra*	5DL <sub>50</sub> (0,7 $\mu$ g/g)	10DL <sub>50</sub> (1,5 $\mu$ g/g)	$\tau$
VN	100%	80%	1/12.800
AgS 2kGy	100%	80%	1/12.800
AgS 3kGy	60%	40%	1/25.600
AgS 5kGy	40%	0%	1/3.200
AgS 10kGy	20%	0%	1/1.600

\* VN= Veneno Nativo; AgS: Agregados Solúveis

**VI. Ensaio Imunoenzimático de Ligação (ELISA):** Micro placas Hemobag foram sensibilizadas com 100 $\mu$ l de antígeno (10 $\mu$ g/ml). Foi realizada uma diluição dos soros partindo-se de 1/500, com um fator de diluição de 2,0. O título do anti-soro dos coelhos e dos camundongos foi determinado na diluição com leitura > 0,1 de abs. IgG de ovelha anti-IgG de coelho ou de camundongo, marcada com peroxidase serviu como anticorpo secundário. O-Dicloridrato de Fenilenediamina (OPD) foi utilizado como substrato. A reação foi parada com ácido cítrico 0,2M. As placas foram lidas a 410nm em um leitor de microplacas Dynatech MR 4000.

## DISCUSSÃO

Avaliando a quantidade de proteína solúvel presente no veneno irradiado podemos observar (tabela 1) que até a dose de 5kGy não ocorrem grandes perdas pela precipitação, entretanto, com a dose de 10kGy cerca de 90% das proteínas precipitaram. Estas proteínas precipitadas foram chamadas de Agregados Insolúveis. Após altas doses de radiação as proteínas tendem a formar agregados e a precipitar [5-7]. Esta precipitação provavelmente está ocorrendo devido a alterações químicas

sofridas pelas proteínas durante a irradiação, como: 1) mudança conformacional, que pode resultar em uma diminuição de sua solubilidade; 2) danos nas cadeias laterais dos aminoácidos e produção de novos grupos; 3) rompimento das ligações peptídicas e formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares [15].

Muitas vezes, estas proteínas agregadas perdem sua atividade biológica. Em vista disto, nós testamos as atividades tóxica e imunogênica do veneno total irradiado, e posteriormente das frações isoladas.

O veneno irradiado com 2kGy se apresentou cerca de 3 vezes menos tóxico do que o veneno nativo, corroborando com os resultados de Murata [5]. As amostras de veneno total, irradiadas com as demais doses apresentaram uma atenuação da toxicidade em mais de 10 vezes, sendo que a amostra de veneno total irradiado com 10kGy se apresentou pelo menos 50 vezes menos tóxica do que o veneno nativo. (tabela 1).

Os animais que receberam os venenos irradiados como imunógenos, suportaram uma dose 7 vezes maior de antígeno (2,072mg), quando comparados com a quantidade de veneno nativo (0,296mg). Podemos observar que o veneno irradiado com doses iguais ou superiores a 3kGy apresenta suas propriedades tóxicas e imunogênicas bastante alteradas, sendo incapaz de induzir uma boa resposta imunológica, ainda quando administrado em altas concentrações. Por outro lado, o veneno irradiado com 2kGy apresentou-se cerca de 3 vezes menos tóxico, porém com suas propriedades imunogênicas preservadas, resultando assim em uma curva de titulação bastante superior quando comparada à do veneno irradiado com outras doses (figura 5).

Quando este veneno foi cromatografado e foram separadas as frações irradiadas não agregada (FINAs) e os agregados solúveis, nós pudemos observar que as FINAs de 2 e 3kGy mantiveram parte de sua toxicidade, enquanto que os compostos de maior e variado peso molecular (agregados solúveis) se apresentaram cerca de 15 vezes menos tóxicos para todas as doses, corroborando com os resultados de Nascimento [7], onde verificou que os agregados da crotoxina se apresentaram praticamente atóxicos (mantendo-se imunogênicos). Não foi possível realizar a cromatografia de exclusão molecular do veneno irradiado com 10kGy, pois a maior parte das proteínas em solução foram precipitadas durante a irradiação, resultando assim em uma solução com concentração protéica muito baixa para ser purificada.

As alterações moleculares sofridas pelas proteínas durante a irradiação foram observadas através do perfil de eluição destas amostras em coluna de exclusão cromatográfica.

A capacidade imunogênica dos agregados solúveis obtidos com todas as doses de radiação foi semelhante (imunização de camundongos). Nós observamos que tanto os agregados, quanto o veneno nativo induziram um perfil de produção de anticorpos semelhante. A eficiência destes anticorpos, quando testados quanto à sua capacidade neutralizante, não foi correlacionada com o título, como

observado por Murata [5], sendo que os anticorpos mais eficientes na neutralização da toxicidade (teste "in vivo") foram aqueles produzidos contra o veneno nativo e contra o veneno irradiado com 2kGy, apresentando ambos uma capacidade de proteger 100% dos animais que receberam um desafio de 5 DL<sub>50</sub>, e 80% dos animais que receberam 10DL<sub>50</sub>.

## CONCLUSÕES

- A dose de 2kGy atenuou consideravelmente o veneno crotálico, possibilitando assim o inóculo de grandes quantidades deste como antígeno, ocasionando uma excelente resposta imunológica.

- Os agregados solúveis induzidos pela dose de 2kGy se mostraram praticamente atóxicos, porém tão eficientes quanto o veneno nativo na indução da formação de anticorpos capazes de neutralizar "in vivo" a alta toxicidade do veneno crotálico.

- Doses iguais ou superiores a 3kGy de radiação gama causam grandes danos, tanto à toxicidade, quanto à capacidade imunogênica deste veneno, sendo portanto desaconselháveis em procedimentos de hiperimunização de animais soroprodutores.

## REFERÊNCIAS

- [1] GRASSET, E. Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 38: 463-488, 1945.
- [2] COSTA, L.M.; TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C. et al. Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*, in natura, tratado com formaldeído e submetido à ação térmica. *Vac. Soros* 1: 24-29, 1985.
- [3] DANIEL, J.P.; HENEINE, L.G.D.; TAVARES, C.A.P. et al. Generation of protective imune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controled iodination. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 713-720, 1987.
- [4] GUIDOLIN, R.; DIAS da SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; et. al. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópico e crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem. Inst. But.* 51: 85-90, 1989.
- [5] MURATA, Y. Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, 1988 (Dissertação de mestrado, IPEN).
- [6] MURATA, Y.; NISHIKAWA, A. K., NASCIMENTO, N. et al. Gamma irradiation reduces the toxic activities

of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon* 28: 595, 1990

[7] NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; et al. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, 43: 123-131, 1996.

[8] SOUZA-FILHO, J.N.; GUARNIERI,-CRUZ, M.C.; MURATA, Y et al. Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25: 103-113, 1992

[9] de PAULA, R.A. Obtenção e avaliação de anticorpos induzidos por veneno e crotoxina irradiados em fonte de <sup>60</sup>Co. São Paulo, 1995 (Dissertação de Mestrado, IPEN)

[10] 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, IPEN).

[11] CARDI, B.A. Estudo morfofisiológico comparativo de crotoxina nativa e irradiada em tecidos e células de camundongos CBAJ/J. São Paulo, 1995 (Dissertação de Mestrado, IPEN).

[12] ROGERO, J.R. & NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J.Venom. Anim. Toxins*, Vol.1 N<sup>o</sup> 1, pp7-10,1995.

[13] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248, 1976.

[14] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*, pp.23 Geneva, 1981

[15] SKALKA, M & ANTONI, F. Effect of radiation on the biological properties of proteins. *Proceedings of Radiatin Sensitivity of Toxins and Animal Poisons*, IAEA - Vienna, 1970

## ABSTRACT

*Crotalus durissus terrificus* venom was irradiated in solution, at 2,000; 3,000; 5,000 and 10,000 Gy in a <sup>60</sup>Co source, in order to find the dose enough to detoxify the crude venom without destroying its immunological properties at the same time it was observed the amounts of aggregates formation, since it has been showed that they are important during detoxification of crotoxin, main toxin

of *Crotalus durissus terrificus* venom. Exclusion chromatographic methods has indicated that those aggregates formation increase according to the radiation dose elevation.

The venom irradiated with 2,000Gy dose presented levels of toxicity around three times less than the non irradiated one; while venoms irradiated with 3,000Gy were 10 times and those irradiated with 5,000 and 10,000Gy were at least 20 times less toxic than the non-irradiated.

On the other hand, the 2,000 Gy dose was the best in producing antibodies with neutralization power to the non irradiated venom, tested in rabbits, using a classical immunization schedule.