

ESTUDO SOBRE OS AGREGADOS FORMADOS DURANTE A IRRADIAÇÃO DA CROTOXINA

Cláudio Fontes Souza, José Roberto Rogero
Divisão de Radiobiologia - TBR

OBJETIVO

Venenos possuem geralmente uma baixa imunogenicidade e uma considerável toxicidade [1] dificultando a produção de soro e consequentemente o tratamento de acidentes ofídicos. Métodos de destoxicação podem auxiliar e melhorar a soroprodução. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a crotoxina, principal toxina do veneno de cascavel, bioquímica, biológica e imunologicamente, assim como os agregados oriundos da irradiação gama através da fonte de ^{60}Co .

METODOLOGIA

Purificação da Crotoxina

O veneno crotálico total foi solubilizado e aplicado em uma coluna de exclusão molecular. Frações contendo o "pool" da crotoxina foram coletadas, liofilizadas e o produto final, aplicado em uma coluna de resina aniônica Mono Q, em um sistema FPLC.

Irradiação da proteína

A proteína purificada, foi irradiada em solução acidificada com dose de 2000 Gy, na concentração de 2 mg/ml, determinada pelo método de Bradford [2]

Atividade Tóxica

A determinação da toxicidade das amostras do veneno irradiado ou não foi determinada a partir da mortalidade e a dose letal 50% (DL_{50}), calculada pelo método de Spearman-Kärber [3].

Imunização dos animais

Foram utilizados camundongos machos, (4 por grupo), inoculados com crotoxina nativa, irradiada, agregados e CISA (crotoxina irradiada sem agregado), sendo que todas as amostras foram emulsificadas ao adjuvante de Freund. O inóculo foi feito pela via intradérmica e foram feitas sangrias semanais para obtenção do soro.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O soro obtido foi separado e testado afim de se medir a sua capacidade de reagir com o antígeno homólogo.

Neutralização "in vivo"

Os animais utilizados para a imunização com agregados ou crotoxina irradiada sem agregados (CISA), após seis semanas do início do processo, foram desafiados com injeção intraperitoneal, com 15 ou 46 DL_{50} de crotoxina não irradiada.

Neutralização "in vitro"

Diferentes concentrações de crotoxina foram incubadas com o soro anti-agregado, diluído 1/10 por uma hora. As amostras foram injetadas em camundongos pela via intraperitoneal, seguindo o protocolo descrito por Middlebrook, 1991[4].

RESULTADOS

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, revelou quatro componentes principais: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (Figura 1).

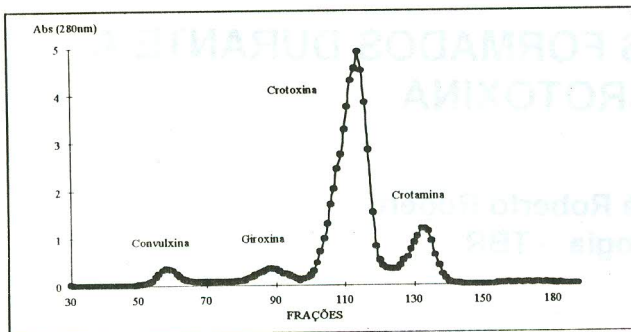


Figura 1 - Perfil cromatográfico de veneno de *Crotalus durissus terrificus* em coluna Sephadex G-100, eluída em tampão formiato de amônio 0,1M e pH 3,0.

Após a irradiação com 2000 Gy formaram-se compostos de alto peso molecular atóxicos (Tabela 1.), e uma fração não agregada (CISA- crotoxina irradiada sem agregados) (Figura 2.).

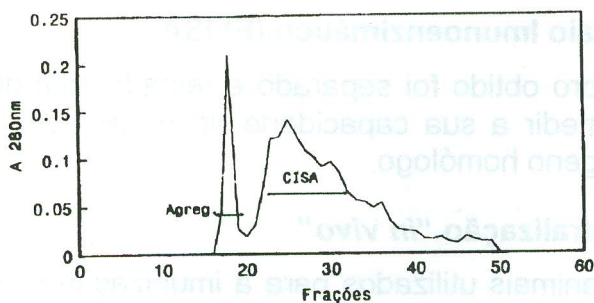


Figura 2. Perfil cromatográfico da crotoxina irradiada, em uma coluna Sephacryl S-100 em tampão acetato 0,1 M.

Tabela 1. DL₅₀ da crotoxina nativa e irradiada

Amostra testada	DL ₅₀ (µg/g)
crotoxina nativa	0,06
crotoxina irradiada	0,11
crotoxina irradiada s/ agregado	0,06
agregado	>2,5

Todas as amostras foram capazes de induzir formação de anticorpos nos camundongos. Devido aos agregados apresentarem-se desprovidos de toxicidade e mesmo assim induzirem formação de anticorpos, este soro foi o selecionado para os testes de neutralização.

Os camundongos que receberam as misturas compostas de diferentes concentrações da toxina e soro anti-agregados, no ensaio de neutralização *in vitro*, puderam suportar até 9 DL₅₀ da toxina nativa.

No experimento de Neutralização *in vivo*, 75% dos animais imunizados com agregados puderam suportar 15 DL₅₀ da crotoxina não irradiada.

CONCLUSÕES

A irradiação da crotoxina com 2000 Gy resulta em agregação da molécula. Os agregados são atóxicos porém imunogênicos formando anticorpos que são capazes de neutralizar a crotoxina não irradiada. Assim, os agregados apresentam-se como imunógeno ideal para a produção de soro anticrotálico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]MAGALHÃES, R. A, RIBEIRO, M. M. F., RESENDE, N. A and AMARAL C. F. S. Rbdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Tro. São Paulo*. 28,228-233, 1986.
- [2]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
- [3]W.H.O., *Progress In The Characterization Of Venoms And Standartization Of Antivenoms*. Geneva: (Publication N° 58) 1981.
- [4] MIDDLEBROOK, J. L. Cross-neutralization of phospholipase A2 neurotoxin from snake venoms. *Toxicon* 29: 1481-1488, 1991.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq - PIBIC/IPEN