

BR8922183

INIS-BR--1740

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

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA
NO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

YOKO MURATA

Disertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Nuclear.
Orientador: *Dr. José Roberto Regere.*

SÃO PAULO
1988

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

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NO VENENO DE
Crotalus durissus terrificus

YOKO MURATA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Tecnologia Nuclear.

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO

1988.

A meus pais,
que me transmitiram a vida e
têm sabido respeitar meus
caminhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. JOSÉ ROBERTO RÓGERO,
orientador, pela paciência sempre presente e pelos esforços que
tornaram possível a realização desta dissertação.

Aos Dns. CLÁUDIO RODRIGUES,
Superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,
ROBERTO FÚLFARO,
Diretor de Aplicações de Técnicas Nucleares,
LAÉRCIO ANTÔNIO VINHAS,
Diretor de Segurança Nuclear e
NÉLIDA LÚCIA DEL MASTRO,
Chefe da Divisão de Radiobiologia,
pelo interesse e apoio na execução deste trabalho.

À CAPES,
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
pela bolsa concedida.

A TODOS que de uma maneira ou outra contribuíram na realização
do trabalho.

em especial,
Ao meu guia espiritual, pela sua luz.

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NO VENENO DE

Crotalus durissus terrificus

YOKO HURATA

RESUMO

As radiações ionizantes podem promover alterações na estrutura protéica levando à perda de sua atividade biológica. Desta forma é importante verificar se estas radiações podem reduzir a toxicidade sem alterar a capacidade imunogênica do veneno de serpentes, pela escolha das condições de irradiação adequadas. Estes dados poderão ser explorados como método rápido de preparação de toxóides.

Um "pool" de veneno de *Crotalus durissus terrificus* crotamina positivo, foi dissolvido em cloreto de sódio 0,15 M e o sobrenadante irradiado com radiação gama de uma fonte de ^{60}Co . Foram utilizadas doses de 100, 250, 500, 750, 1.000, 1.500 e 2.000 Gy numa taxa de dose de 1.190 Gy/h. As determinações de grupos sulfidrílicos livres, enzimas caseinolíticas, eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia por exclusão molecular foram analisadas para verificar as possíveis modificações estruturais nas proteínas, presentes no sobrenadante das amostras irradiadas, assim como a toxicidade em camundongos foi testada em todas as amostras. As propriedades antigênicas do veneno irradiado foram avalia-

das por imunodifusão e por imunoprecipitação. Os resultados indicam que as características bioquímicas mantêm inalterada até a dose de 500 Gy. Nas doses acima desta, há modificações estruturais, assim como aumento das doses letais 50%, de modo proporcional a dose.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON
Crotalus durissus terrificus VENOM

YOKO MURATA

A B S T R A C T

Exposure to ionizing radiation is known to cause loss of protein activity function due to destruction of critical structures of the molecule. It was of interest to know if one could reduce the toxicity of snake venom proteins with the retention of their immunogenicity by a suitable choice of radiation dose. If so, the method could be profitably exploited for the rapid preparation of venom toxoid.

A pool of crotonamine positive *Crotalus durissus terrificus* venom was dissolved in 0.15 M NaCl and the supernatant irradiated using ^{60}Co . Doses of 100, 250, 500, 750, 1,000, 1,500 and 2,000 Gy were used at a dose rate of 1.190 Gy/h. The presence of free SH, casein hydrolytic degradation, SDS-PAGE and molecular exclusion chromatography analysis together with LD₅₀ determination in mice were used to test the structural properties of irradiated and non irradiated fractions. The antigenic properties of samples were investigated by immunodiffusion and immunoprecipitation. The results indicate that the biochemical characteristics were maintained up to 500 Gy. On the other hand higher radiation doses

ÍDICE

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
I.1. Irradiação de toxinas	1
I.2. Característica do veneno de <i>Crotalus durissus terri-</i> <i>cus</i>	3
II - OBJETIVO	6
III - MATERIAIS E MÉTODOS	7
III.1. Preparo e irradiação das amostras de veneno de cascavel	7
III.2. Dosagem de proteínas	8
III.3. Determinação de grupos sulfidrilicos livres	9
III.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sul- fato de sódio EGPA-SDS	10
III.5. Cromatografia de exclusão molecular	14
III.6. Espectro de absorção na região ultravioleta	16
III.7. Determinação das enzimas caseinolíticas	17
III.8. Imunodifusão	19
III.9. Imunoprecipitação	20
III.10. Determinação da atividade tóxica	23
IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
V - CONCLUSÕES	52
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

I. INTRODUÇÃO

I.1. IRRADIAÇÃO DE TOXINAS

A espécie *Crotalus durissus*, conhecida como cascavel, se acha disseminada pelos distritos secos e áridos do nordeste, leste, centro, oeste e sul do Brasil¹.

Na zona alta e seca da porção sul-oriental e meridional, que inclui São Paulo até o Rio Grande do Sul, encontramos a subespécie *C. d. terrificus*¹.

Os acidentes com esta serpente são muito frequentes, sendo letais quando não são socorridos de forma rápida e adequada. Nestes casos, o único tratamento de eficácia comprovada é a soroterapia.

O soro anticrotálico é obtido em cavalos por hiperimunização, estimulando a produção de anticorpos. Entretanto a baixa imunogenicidade somada a alta toxicidade do veneno de cascavel, impede a inoculação de doses capazes de fornecer uma resposta imunológica adequada, além de prejudicar o animal produtor, tendo como consequência uma baixa produtividade do soro²¹.

Por essas razões é necessário o desenvolvimento de técnicas que reduzam a toxicidade e aumentem a resposta imunológica, as quais diminuirão o tempo de resposta e o custo dispensado na manutenção dos animais e conseqüentemente, uma melhora acentuada na produção de antisoro.

Na literatura, podemos encontrar exemplos de diferentes agentes utilizados nas mais diversas toxinas, na tentativa de se obter produtos menos tóxicos com todas as suas propriedades imunogênicas.

No trabalho de Tejasen e colaboradores⁶⁷, o veneno de *Aphis-*

trodon piscivorus foi submetido à radiação ultravioleta e teve a toxicidade reduzida e as atividades fosfolipásica, proteinásica e fosfodiesterásica inativadas, com manutenção da imunogenicidade. Baride e colaboradores⁵, verificaram as mudanças dos parâmetros bioquímicos dos venenos de *Naja naja*, *Bungarus cheruleus*, *Echis carinatus* e *Vipera russelli*, submetidos a radiação gama ou formalina, observando a polimerização das proteínas. Os autores concluem que a natureza dos polímeros produzidos pela radiação gama é mantida por ligações fracas envolvendo forças secundárias, enquanto que a formalina envolve ligações químicas fortes, além da observação da retenção da capacidade de reagir com o antisoro correspondente. Daniel e colaboradores²¹ detoxificaram o veneno de *C. d. terrificus* por iodação, mantendo a imunogenicidade do veneno.

A radiação gama também vem sendo empregada como agente atenuante pois observamos que ela provoca alterações nas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas, que são detectáveis pelas mudanças nas propriedades químicas e físico-químicas. As modificações se devem à excitação e ionização das proteínas ao interagirem com a radiação ionizante, ou quando em meio aquoso, essas substâncias reagem com as espécies resultantes da radiólise da água (OH^\cdot , e^- aquoso, H_2O_2 e H^\cdot) altamente reativas¹³.

Os produtos da radiólise da água podem, por exemplo, reagir com proteínas abstraindo o hidrogênio do carbono alfa, o hidrogênio de grupos sulfidrilas, reagir com anéis aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais livres altamente reativos^{13,16}. As modificações podem estar ligadas às atividades enzimáticas, tóxicas e imunológicas das proteínas.

Podemos citar alguns trabalhos neste sentido: Puranananda⁴⁹ verificou que soluções do veneno de ofídeos da família Elapidae, quando

irradiadas com raios gama na dose de 30 KGy, perdem a toxicidade e mantêm a capacidade de imunização. Salafranca⁵⁸ submeteu solução de veneno de *Naja naja philippinensis* em ⁶⁰Co nas doses de 2,5; 5,0 e 10,0 KGy mantendo a toxicidade de 33, 66 e 43 por cento respectivamente em relação ao não irradiado, enquanto os componentes antigênicos mantiveram-se praticamente inalterados. Kankonkar e colaboradores³⁵ observaram que nas soluções de veneno de *Naja naja*, a dose de irradiação necessária para a detoxificação depende da concentração da solução, e que até a dose de 20 KGy a imunogenicidade mantém-se inalterada. Herrera e colaboradores³² verificaram o efeito da radiação gama sobre a atividade biológica e enzimáticas nos venenos de *Lachesis muta* e *Bothrops atrox*, irradiados a seco, nas doses de 1,0; 5,0 e 10,0 KGy; observando que o efeito hemorrágico foi reduzido proporcionalmente com o aumento da dose, assim como há inativação das atividades exonucleásica, fosfolipásica, caseinolítica, tanesterásica, da enzima trombina-símile, fibrinolítica, 5'nucleotidásica e endonucleásica, sendo estas últimas as mais sensíveis.

Desta forma, as características como rapidez e facilidade de padronização, somadas aos resultados de atenuação com manutenção da imunogenicidade das diferentes toxinas, nos estimula a verificar a possível utilização da metodologia de detoxicação por irradiação em veneno crotálico.

1.2. CARACTERÍSTICA DO VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS

O veneno de cascavel tem características neurotóxicas^{4,10,57} associadas em menor escala com a capacidade hemolítica⁴, proteolítica⁴, coagulásica⁵⁰, nefrotóxica⁴ e imunodepressora⁵⁹. Até agora foram isoladas as seguintes neurotoxinas: crotoxina^{8,9,11,23,25,26,27,28,31,33, 38, 44,45,55,63,64}, crotamina^{9,18,19,20,30,37,60}, convulxina^{9,48}, giroxina^{6,9,61} e deltatoxina¹⁰.

A crotoxina é a responsável pela alta toxicidade, atuando a nível de junção neuromuscular, bloqueando a transmissão de impulsos nervosos^{10,23}. A administração via parenteral em camundongos provoca paralisia flácida e morte por paralisia respiratória, sendo a dose letal 50% por via intra-venosa 82 µg/Kg em média⁹. Seu peso molecular é estimado em 23.000 daltons, sendo composta por duas subunidades, uma básica, a fosfolipase, com cerca de 13.400 daltons; e uma ácida, a crotapotin, com peso molecular por volta de 8.300 daltons.

A crotamina é um polipeptídeo básico com pI 10,3 e peso molecular de 4.880 daltons³⁷, característica de uma variedade do veneno de *C. d. terrificus* encontrada no território Argentino, Boliviano, e no norte do Paraná e parte do estado de São Paulo^{1,10,60}. Esta toxina altera a permeabilidade ao sódio nas membranas das fibras musculares, dando lugar a respostas iterativas¹⁰. A dose letal 50% em camundongos é em média 1.500 µg/Kg quando injetada por via intra venosa⁹.

A convulxina produz convulsões, perturbações respiratórias e circulatórias assim como agrega e lisa plaquetas¹⁰. Sua DL₅₀ em camundongos é estimada em 524 µg/Kg por via intravenosa⁹.

A giroxina provoca uma síndrome convulsiva peculiar em camundongos, caracterizada pelos movimentos circulatórios do corpo ao longo de um eixo longitudinal⁹. A deltatoxina é pouco conhecida, altera acentuadamente a permeabilidade vascular causando hemoconcentração¹⁰.

O quadro clínico do envenenamento crotálico é, em resumo, o seguinte: no local da picada, dor de intensidade variável, seguida de na restesias locais ou regionais (desordem nervosa caracterizada por sensações anormais e alucinações sensoriais). Frequentemente não se observa nenhuma lesão local, podendo, entretanto, ocorrer em alguns casos, discreto edema. Cerca de uma hora após a picada, iniciam-se as manifestações

neurotóxicas, com acometimento inicial da motricidade ocular extrínseca e ptose palpebral. Em casos extremamente graves, esses sintomas progridem rapidamente e levam ao óbito em poucas horas¹⁰.

II. OBJETIVO

Desenvolver metodologia para irradiação de veneno bruto de cascavel em solução aquosa, particularizando os seguintes parâmetros:

a) estudo das alterações bioquímicas e biológicas produzidas pela radiação no veneno total.

b) determinação da dose de radiação gama para reduzir atividade de tóxica e manutenção da atividade antigênica e imunogênica.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. PREPARO E IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VENENO DE CASCAVEL

Em função da metodologia de produção do soro no Instituto Butantan, foi escolhida a dissolução do veneno seco e cristalizado em solução de NaCl 0,15 M, como etapa inicial. A irradiação de proteínas em solução apresenta vantagem em relação a irradiação a seco, pois, requer uma dose de radiação menor para ocorrer modificações estruturais nas proteínas devido aos produtos da radiólise da água, que são altamente reativos e provocam alterações seletivas na proteína^{13,49}.

A - REAGENTES

- a) Veneno de cascavel - *Crotalus durissus terrificus* - , cro-tamina positivo, na forma seca e cristalizada.
- b) Solução de NaCl 0,15 M, em água destilada
- c) Fonte de radiação - Fonte de ⁶⁰Co Gammacell 220 da Atomic Energy of Canada Ltda.

B - PROCEDIMENTO

- a) Foram preparados 120 ml de solução de veneno de cascavel na concentração de 2 mg/ml em solução de NaCl 0,15 M.
- b) A solução foi filtrada em papel Whatman nº 1 e distribuída em tubos de ensaio de 12,5 x 1,5 ml cada.
- c) A amostra foi submetida à radiação gama nas doses de 100 , 250, 500, 750, 1.000, 1.500 e 2.000 Gy numa taxa de dose de 1.190 Gy/h.
- d) Foram separados 2 tubos de amostra não irradiada para serem utilizados como referência nos ensaios.

III.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Método de Lowry³⁹ modificado por Miller⁴⁰.

Para quantificar as possíveis perdas por precipitação e padronizar as concentrações nas reações, foram determinadas as concentrações protéicas das amostras irradiadas ou não irradiadas.

A - REAGENTES

- a) Na_2CO_3 10% em solução de NaOH 0,5 M.
- b) CaSO_4 5% em água destilada.
- c) Tartarato de Na e K 1% em água destilada.
- d) Reagente de tartarato de cobre
0,5 ml de b
4,5 ml de c
50,0 ml de a
- e) Reagente de Folin Ciocauteau 0,17 N.

B - PADRÃO

Foram utilizadas soluções de soro albumina bovina (Sigma) nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,500 mg/ml.

C - PROCEDIMENTO

- a) Em 200 μl de amostra foi adicionado 1 ml do reagente de tartarato de cobre. Após agitação foi deixado à temperatura ambiente por 10 min.
- b) Adicionou-se 3 ml do reagente de Folin Ciocauteau. Agitou-se e incubou-se a 50°C por 10 minutos.
- c) Após esfriamento foi lido a absorvância em 650 nm.

D - TRATAMENTO DOS DADOS

Os pontos utilizados na construção da curva padrão assim como as amostras foram feitas em quintuplicatas.

Os dados da curva padrão foram ajustados a uma função linear do tipo:

$$Y = AX + B \quad (1)$$

onde

Y = concentração e σY = erro da concentração;

X = absorvância observada e σX = erro da absorvância;

A = coeficiente angular da reta e σA = erro do coeficiente angular;

B = coeficiente linear da reta e σB = erro do coeficiente linear.

Pelo método dos mínimos quadrados do Programa SAS⁵¹ implantado no Departamento de Processamentos de Dados do IPEN, obtivemos os valores de A e B.

$$A = 248,08 \quad \sigma A = 1,67$$

$$B = 0,00 \quad \sigma B = 0,00$$

A partir das absorvâncias obtidas experimentalmente temos as concentrações das amostras, utilizando a curva padrão. O erro da concentração (σ conc), resultante da propagação de erros foi calculado segundo a equação 2:

$$\sigma Y = \sqrt{(X \cdot \sigma A)^2 + (A \cdot \sigma X)^2 + \sigma B^2} \quad (2)$$

III.3. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS SULFIDRÍLICOS LIVRES

Método de Ellman²².

Para determinar grupamentos SH-livres que podem se formar du-

rante a irradiação pela quebra de pontes S-S, empregou-se o processo colorimétrico de Ellman modificado⁴⁴, que utiliza o ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzôico.

A - REAGENTES

- a) Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0
- b) EDTA 0,1 M em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0
- c) Reativo de Ellman (20 mg de ácido 5,5' ditiobis-nitrobenzôico em 5 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0).

B - PADRÃO

Foram utilizadas soluções de cisteína dissolvida em solução de NaCl 0,15 M nas concentrações de 0,83; 1,00; 1,25; 1,67; 2,50 e $5,00 \times 10^{-4}$ M.

C - PROCEDIMENTO

- a) 0,5 ml de amostra
- b) 0,88 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0
- c) 0,03 ml de solução de EDTA
- d) Completou-se o volume para 3,0 ml com água destilada
- e) Colocou-se 0,02 ml de Reativo de Ellman
- f) Após 10 minutos, leu-se a absorvância a 412 nm

III.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO - EGPA-SDS

A EGPA-SDS foi utilizada para detectar as variações de peso molecular decorrentes da formação de agregados e quebras das proteínas induzidas pela radiação. Essa técnica apresenta boa sensibilidade e alto poder de resolução, baseando-se em características de carga e/ou peso mo-

lecular da amostra^{14,29}.

Os géis de poliacrilamida formam-se a partir de polimerização via radical livre, do monômero acrilamida e de ligações cruzadas do co-mo-nômero N,N-metileno-bis-acrilamida. Variando-se a concentração destes reagentes obtêm-se diferentes graus de polimerização, e consequentemente uma matriz com poros maiores ou menores. Assim, o tamanho dos poros pode ser ajustado de forma a se otimizar a separação dos componentes da amostra^{14,29}.

A - PREPARAÇÃO DO GEL²⁹

i. Reagentes

- a) Solução de acrilamida e bis-acrilamida (30:0,8), em água destilada.
- b) Solução do gel de empilhamento: tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.
- c) Solução do gel de resolução: tampão Tris-HCl 3,0 M pH 8,8.
- d) Solução do reservatório superior e inferior: tampão Tris 0,025 M/Glicina 0,192 M pH 8,3 com 1% de Dodecil Sulfato de Sódio.
- e) Solução de Dodecil Sulfato de Sódio 10% em água destilada.
- f) TEMED (N,N,N', N' tetrametil etilenodiamina).
- g) Persulfato de amônia 1,5% em água destilada.

i.i. Preparação do gel de eletroforese

Para obtermos o gel de empilhamento a 2,5% em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; e o gel de resolução a 15% em tampão Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, seguimos o esquema:

Soluções	Gel de empilhamento (volume em ml)	Gel de resolução (volume em ml)
acrilamida/bis-acrilamida	2,5	15,0
tampão de empilhamento	5,0	-
tampão de resolução	-	3,75
SDS 10%	0,2	0,3
água destilada	11,3	9,45
TE-ED	0,015	0,015
persulfato de amônia 1,5%	1,0	1,5
Volume final	20,015	30,015

i.i.i. Tampão de Corrida

Foi utilizado nos reservatórios o tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3.

B - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA APLICAÇÃO

Inicialmente tratamos a amostra segundo o esquema:

- a) 0,1 g de uréia
- b) 0,1 ml de tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 com 2,0% de SDS e 2,0% de beta-mercaptoetanol.
- c) 0,1 ml de amostra na concentração de 600 µg/ml.
- d) Aquecer por 2 minutos em banho-maria fervente.

Em seguida foram preparadas as amostras para aplicação:

- a) 10 µl de azul bromofenol 0,05% em água destilada.
- b) 1 gota de glicerina.
- c) 5 µl de beta-mercaptoetanol.
- d) 50 µl da amostra tratada.

Foram aplicados 50 μ l de amostra sobre o gel de empilhamento. A placa de gel de poliacrilamida foi submetida a uma diferença de potencial de 150 V por 3 horas com variação de corrente entre 30 e 40 mA.

C - COLORAÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE

Método de Wray⁷⁰

A coloração pelo método de nitrato de prata foi escolhida por apresentar sensibilidade até 0,07 ng/mm² de soro albumina bovina^{65,70}, cerca de 100 vezes mais sensível que o método tradicional de coloração com Coomassie Blue²⁹.

i. Procedimento

Foram elaboradas as seguintes etapas:

- a) Fixar as proteínas no gel com solução de metanol 50% em ácido acético 10% em água destilada, por pelo menos 1 noite
- b) Lavar o gel com metanol 50% em água bidestilada alternando com água bidestilada, por várias vezes.
- c) Retirar a água e adicionar solução de prata amoniacal fresca:

NaOH 0,36% em água bidestilada	21,0 ml
NH ₄ OH 14,8 %	1,4 ml
AgNO ₃ 19,4% em água bidestilada	4,0 ml
água bidestilada q.s.p.	100,0 ml

Deixar nesta solução por 15 minutos sob constante e lenta agitação.

- d) Lavar o gel em água bidestilada durante 5 minutos.
- e) Colocar o gel em solução fresca de ácido cítrico 0,005% e formaldeído 0,010% em água bidestilada.

- f) Deixar a placa nesta solução até o amarecimento das bandas.
- g) Colocar o gel em solução de metanol 50% e ácido acético 10% em água bidestilada para parar a reação, lavando várias vezes nesta solução.
- h) Colocar o gel em solução de metanol 5%, ácido acético 7% , glicerol 3% em água destilada para conservação.

Observação: A prata amoniacal decompõe-se e torna-se altamente explosiva. Portanto, depois de usar, coletar a solução de prata amoniacal em um frasco e precipitar a prata com cloreto, adicionando NaCl saturado e remover o sobrenadante aquoso por aspiração.

III.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

A cromatografia de exclusão molecular foi utilizada num sistema tampão não denaturante, para detectar as variações de peso molecular, decorrentes da formação de agregados e quebras das proteínas introduzidas pela radiação, além de possibilitar uma avaliação semi-quantitativa.

A - REAGENTES

- a) Gel Sephadex G-75 "fine", com partículas de 40-120 μ . Pharmacia Upsalla, Suécia.
- b) Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,45 com NaCl 0,15 M.
- c) Coluna de 100 x 0,9 cm.

B - PADRÕES

Foram utilizadas soluções de "Blue dextran" 2 mg/ml e "Azul

bromo fenol" 0,2 mg/ml para o cálculo de V_0 e V_e respectivamente.

C - PROCEDIMENTO

- a) O gel foi entumescido em tampão por 24 horas.
- b) A coluna foi devidamente empacotada até a altura de 38 cm e calibrada num fluxo de 9,9 ml por hora.
- c) Foram colocadas amostras no volume de 1 ml na concentração de 980 $\mu\text{g/ml}$.
- d) As amostras foram coletadas no coletor de frações LKB, modelo 7000, num volume de 1,1 ml/tubo, num fluxo de 9,9 ml/h.
- e) Nas frações coletadas foram lidas as absorvâncias em 230 nm.

Obs.: A técnica foi realizada a temperatura ambiente.

D - TRATAMENTO DOS DADOS

A partir das curvas de eluição, foram calculados os coeficientes de partição (K_{av}) dos três picos com áreas relevantes, denominados "a", "b" e "c", de cada amostra conforme figuras 2 a 9, segundo a equação 3.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (3)$$

onde

V_e = volume efluente da proteína e σV_e = erro do volume efluente;

V_0 = volume vazio e σV_0 = erro do volume vazio;

V_t = volume total da coluna de gel e σV_t = erro do volume total.

O erro de K_{av} , σK_{av} , foi calculado segundo a equação 4:

$$\sigma K_{av} = \left(\frac{\sigma V_e - \sigma V_o}{V_e - V_o} + \frac{\sigma V_t - \sigma V_c}{V_t - V_o} \right) \times K_{av} \quad (4)$$

O coeficiente de partição das substâncias entre a fase líquida e sólida é uma variável independente da compactação do gel na coluna e permite avaliar o tamanho molecular.

A área de cada pico de absorção em 230 nm foi calculada pelo Programa "Analysis"⁶⁹ em operação no Departamento de Processamentos de Dados do IPEN, considerando a absorvância obtida em cada fração eluída.

III.6. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA

A absorção molecular na região do ultravioleta depende da estrutura eletrônica da molécula, principalmente os sistemas conjugados⁶². Em alguns comprimentos de onda, certos grupos químicos dominam o espectro observado. Estes grupos são chamados cromóforos. Os cromóforos típicos encontrados em proteínas e ácidos nucleicos absorvem luz somente em comprimento de ondas inferiores a 300 nm e podem ser divididos em três classes: ligação peptídica, cadeias laterais e os grupos prostéticos¹⁵.

As cadeias laterais dos aminoácidos: Asp, Glu, Asn, Gln, Arg e His têm transições eletrônicas na mesma região espectral onde ocorre forte absorção da ligação peptídica, sendo quase impossível distingui-las. Por este motivo as propriedades ópticas das cadeias laterais mais utilizadas são aquelas que ocorrem em comprimentos de onda superiores a 230 nm, onde a absorção da ligação peptídica é mínima¹⁵.

Entre 230 e 300 nm, ultravioleta próximo, os efeitos dos aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e Trp) são os mais considerados, além da histidina e dissulfetos (cisteína)¹⁴.

A estrutura da cadeia de aminoácidos permite uma maior ou me-

nor exposição destes grupos, que pode ser alterada pela radiação ionizante.

A - PROCEDIMENTO

Foram analisadas amostras na concentração de 500 µg por ml, no intervalo de 240 a 350 nm, no espectrofotômetro Cary Modelo 118. A leitura foi obtida contra uma solução de NaCl 0,15 M, que foi utilizada como solvente.

III.7. DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS CASEINOLÍTIICAS

Método de Kunitz³⁶

A capacidade do veneno de cascavel digerir a caseína se deve a presença de enzimas proteolíticas⁵³. O método de dosagem da atividade caseinásica foi utilizado com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação neste grupo de enzimas.

A - REAGENTES

- a) Tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,8 em água destilada.
- b) CaCl₂ 0,08 M em água destilada.
- c) Ácido Tri-cloro-acético 5%, em água destilada.
- d) Caseína segundo Hammarsten 2% em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,8; fervido durante 20 minutos.

B - AMOSTRAS PADRÕES

Foram utilizadas soluções de tripsina nas concentrações de 2,4, 6 e 8 µg/0,9 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 em água destilada como padrões.

C - PROCEDIMENTO

Foram realizadas as seguintes etapas:

- a) Em 0,1 ml de CaCl_2 0,08 M, colocar 0,9 ml de amostra
- b) Adicionar 1,0 ml de caseína fervida. Incubar por 30 minutos em banho-maria a 37°C .
- c) Parar a digestão da caseína adicionando 3,0 ml de TCA 5%.
- d) Agitar e incubar por 1 hora em banho de gelo.
- e) Filtrar em papel Whatman nº 1.
- f) Ler a absorvância do filtrado em 280 nm.

D - TRATAMENTO DOS DADOS

Os pontos utilizados na construção da curva padrão foram feitos em quadruplicatas e as amostras em triplicatas.

Os dados da curva padrão foram ajustados a uma função linear do tipo $Y = AX + B$, assim como foram tratados os dados do item III.2.D. Obtivemos os valores de A e B.

$$\begin{array}{ll} A = 13,09 & \sigma A = 0,38 \\ B = 0,00 & \sigma B = 0,00 \end{array}$$

As concentrações correspondentes a tripsina nas amostras foram estimadas a partir das absorvâncias.

Com o intuito de ter valores comparáveis, utilizou-se as concentrações protéicas determinadas no item III.2 e obteve-se as concentrações correspondentes de tripsina por mg de proteína presente na amostra. Os erros destes valores foram calculados segundo a equação 5.

$$\sigma T = \frac{T \cdot 1000}{\text{Proteína}} \cdot \left(\frac{\sigma \text{ tripsina}}{\text{tripsina}} + \frac{\sigma \text{ proteína}}{\text{proteína}} \right) \quad (5)$$

onde:

T = valor correspondente a tripsina em μg para cada miligrama de proteína

σ T = erro do valor de T

Proteína = valor encontrado na dosagem, em cada amostra

σ proteína = erro da dosagem de proteína

Tripsina = valor encontrado na determinação ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

σ tripsina = erro do valor encontrado

III.8. IMUNODIFUSÃO

Método de Ouchterlony^{24,46,47}

A imunodifusão foi utilizada para observar, qualitativamente, a capacidade antigênica das principais frações proteicas do veneno, submetido as várias doses de radiação.

A - REAGENTES

- a) Ágar-ágar 2%, dissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.
- b) Soro anticrotálico com capacidade de neutralizar 1,5 mg de veneno por ml, cedido pelo Instituto Butantan.
- c) Solução de NaCl 0,15 M, em água destilada.
- d) Solução de Negro de amido 0,4% em ácido acético 10%.
- e) Ácido acético 5%
- f) Amostras na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

B - PROCEDIMENTO

Foram efetivadas as seguintes etapas:

- a) Distribuir 4 ml de ágar-ágar dissolvido sobre uma lâmina de microscópio 7,0 x 2,5 cm.

- b) Deixar a lâmina a temperatura ambiente "over night".
- c) Fazer poças de 2 mm de diâmetro, numa distância de 1 cm.
- d) Aplicar as amostras e o soro nas poças adjacentes.
- e) Deixar em câmara úmida "over night", a temperatura ambiente.
- f) Lavar a lâmina com solução de NaCl 0,15 M, pelo menos 15 vezes.
- g) Lavar a lâmina com água destilada por 15 vezes.
- h) Secar a lâmina a 45°C.
- i) Corar a lâmina com Negro de amido 4%, por 10 minutos.
- j) Descorar com ácido acético 5%.
- l) Lavar a lâmina com água destilada e deixar a temperatura ambiente.

III.9. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Método segundo Kabat³⁴

A imunoprecipitação foi utilizada para observar quantitativamente, a capacidade antigênica das proteínas do veneno submetido às várias doses da radiação^{2,7,24,44,68}.

A - REAGENTES

- a) Soro anticrotálico com capacidade para neutralizar 1,5 mg de veneno por ml, cedido pelo Instituto Butantan.
- b) Solução de NaCl 0,15 M em água destilada.
- c) NaOH 0,1 N em água destilada.
- d) Amostra de veneno nas concentrações de 93,75; 187,50 ; 250,00; 375,00; 500,00; 750,00 µg/ml.

B - PROCEDIMENTO

Foram realizadas as seguintes etapas:

- a) Em 0,8 ml de amostra adicionar 0,2 ml de soro anticrotálico, a 37°C.
- b) Incubar por 1 hora a 37°C.
- c) Incubar por 24 horas a 4°C.
- d) Centrifugar por 10 minutos a 2.000 rpm.
- e) Lavar o precipitado por 3 vezes com solução de NaCl 0,15 M a 2.000 rpm.
- f) Ressuspender o precipitado com 2 ml de NaOH 0,1 N.
- g) Ler a absorvância em 280 nm.

C - TRATAMENTO DOS DADOS

As amostras em diferentes concentrações permitiram obter uma curva da quantidade de precipitado, dada pela absorvância (abs), em função da concentração de veneno. Porém para comparar os resultados nas diferentes doses de irradiação, foi necessária uma transformação logística¹² (equação 6):

$$Y = \ln \frac{\text{abs}/10}{1 - \text{abs}/10} \quad (6)$$

obtendo assim uma função linear (equação 7):

$$Y = A \cdot \text{concentração de veneno} + B \quad (7)$$

onde

A = coeficiente angular da reta

B = coeficiente linear da reta

Os valores de A e B foram calculados pelo método dos mínimos quadrados do programa SAS⁵¹.

Duas retas são consideradas paralelas quando apresentam o mesmo coeficiente, ou seja, quando $A_1 = A_2$.

Para verificar o paralelismo das curvas, utilizou-se o teste $F^{13,17}$ entre a soma de quadrados dos resíduos dos modelos completo e reduzido, comparando os valores de F_a

Modelo Completo (MC)	Modelo Reduzido (MR)
$\begin{cases} Y_{NI} = A_1 \cdot \text{conc} + B_1 \\ Y_{ir} = A_2 \cdot \text{conc} + B_2 \end{cases}$	$\begin{cases} Y_{NI} = A \cdot \text{conc} + B_1 \\ Y_{ir} = A \cdot \text{conc} + B_2 \end{cases}$

$$H_0 : A_1 = A_2$$

O valor de F_a é obtido pela relação da equação 8:

$$F_a = \frac{(SQR_R - SQR_C) / (GL_R - GL_C)}{QMR_C} \quad (8)$$

onde:

SQR_R = soma dos quadrados dos resíduos do modelo reduzido

SQR_C = soma dos quadrados dos resíduos do modelo completo

GL_R = graus de liberdade do modelo reduzido

GL_C = graus de liberdade do modelo completo

QMR_C = quadrado médio dos resíduos para o modelo completo

Para verificar se as retas são coincidentes, comparou-se os valores de B, utilizando o teste F entre a soma de quadrados dos resíduos dos modelos reduzido e reduzidíssimo, comparando-se os valores de F_b .

Modelo Reduzido (R) Modelo Reduzidíssimo (Z)

$$\begin{cases} Y_{NI} = A \cdot \text{conc} + B_1 \\ Y_{iR} = A \cdot \text{conc} + B_2 \end{cases} \quad \left\{ Y = A \cdot \text{conc} + B \right.$$

$$H_0 : B_1 = B_2$$

O valor de F_b é obtido pela relação da equação 9:

$$F_b = \frac{(SQR_Z - SQR)/(GL_Z - GL_R)}{QRR} \quad (9)$$

onde:

SQR_Z = a soma dos quadrados dos resíduos do modelo reduzidíssimo

GL_Z = graus de liberdade do modelo reduzidíssimo

QRR = o quadrado médio dos resíduos para o modelo reduzido

III.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA

A determinação da toxicidade das amostras irradiadas ou não irradiadas foi feita pelo cálculo da dose letal 50% pelo método de Reed e Muench⁵².

A medida da DL_{50} foi realizada em camundongos albinos agrupados em pesos entre $(21 \pm 1)g$ e $(24 \pm 1)g$ cada um, pela via intraperitoneal, utilizando 5 grupos de 4 camundongos cada, mais um grupo controle.

De cada amostra foram feitas diluições adequadas, (tabela 1) obtendo S1, depois em série de 3:4, e injetadas num volume de 0,2 ml em cada animal.

As mortes e sobrevidas foram anotadas 24 horas após as injeções. O cálculo foi realizado segundo as equações 10 e 11

$$d.p. = \frac{50 - Y}{X - Y} \quad (10)$$

$$c = \log Z + (d.p. \times \log 1,33) \quad (11)$$

onde:

X = % de mortalidade na diluição logo acima do valor que provocou 50% de morte ou mais.

Y = % de mortalidade na diluição logo abaixo do valor que provocou 50% de morte ou mais

Z = % diluição inferior ao valor que provocou 50% de morte

d.p. = distância proporcional

$\log 1,33$ = logaritmo decimal do fator de diluição.

O antilog de "c" (equação 11) forneceu a diluição exata em que ocorreu 50% de morte, e consequentemente a concentração em mg/kg de peso.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a quantidade de proteína presente no veneno irradiado, podemos observar pela tabela 2 que a partir de 750 Gy, ocorrem perdas parciais das proteínas solúveis. Supomos que este fato seja consequência da formação de radicais na superfície protéica, possibilitando assim a formação de agregados, ou mesmo pela mudança conformacional que reduz sua solubilidade^{5,13,35}. Neste trabalho apenas estudamos a parte solúvel das amostras.

Alguns autores como Puranananda⁴⁹, Kankonkar e colaboradores³⁵, também irradiaram veneno de diferentes serpentes (na faixa de 20 a 30 KGy), em solução, não observando precipitação na amostra. Isto mostra a importância das diferentes condições de irradiação (dose, taxa de dose, tipo de amostra, concentração) em cada experimento.

Sabendo-se que a radiação ionizante pode proporcionar reduções das ligações dissulfetos¹³, tentamos detectar a presença de possíveis grupos sulfidrílicos, imediatamente após a irradiação. De acordo com o método de Ellman, não foram observados grupos sulfidrílicos livres neste experimento, discordando parcialmente com o trabalho realizado anteriormente⁴³, onde na dose de 1.000 Gy (taxa de dose 1.250 Gy/h), detectou-se grupos sulfidrílicos livres. Estes resultados sugerem que a redução das ligações dissulfetos podem ocorrer, mas sua oxidação muito rápida, pode por vezes inviabilizar sua quantificação.

Assim como as ligações dissulfetos, em princípio as ligações da cadeia polipeptídica também podem ser rompidas, embora seja normal uma dificuldade maior em rompê-las. Os efeitos mais esperados a nível molecular são a descarboxilação, desaminação e a saturação de ligações duplas³⁵. Com o intuito de observar as possíveis quebras nas proteínas, utilizamos

a técnica de eletroforese num sistema tampão denaturante, onde as cadeias são separadas de acordo com seu tamanho.

Na figura 1 observamos que o padrão dos perfis eletroforéticos das amostras não se altera, embora seja observada uma difusão discreta e crescente das bandas, a medida que a dose de irradiação aumenta. Portanto os dados fornecidos pela eletroforese (EGPA-SDS) asseguram-nos de que não há rompimento das cadeias polipeptídicas de modo a produzir fragmentos de determinados tamanhos, nem agregados, que possam ser detectáveis nas condições do experimento. É conveniente lembrar que Baride e colaboradores⁵ observaram através da comparação entre a eletroforese num sistema catiônico, num sistema denaturante e pela filtração em gel, que a radiação gama dá origem a ligações fracas envolvendo forças secundárias, enquanto que a formalina ocasiona ligações químicas fortes em soluções de veneno de *Naja naja*, *Bungarus cheruleus*, *Echis carinatus* e *Vipera russelli*.

Além de analisadas num sistema denaturante, as amostras foram submetidas também a uma técnica não denaturante, à cromatografia por exclusão molecular, que permite a análise de cada fração separadamente^{54,66}. O perfil da amostra não irradiada (figura 2) é semelhante àquelas obtidas por Rogero⁵⁵, Takeda e colaboradores⁶⁶, evidenciando a presença de diversos componentes. As amostras irradiadas (figuras 3 a 9) foram analisadas e comparadas com a não irradiada pelas áreas e pelos coeficientes de partição dos picos considerados relevantes (figuras 2 a 9, picos "a", "b" e "c"). A observação das três principais áreas indicaram que até a dose de 1.000 Gy as frações presentes no veneno não foram alteradas de forma significativa (figura 10 e tabela 3). Nas doses de 1.500 a 2.000 Gy observamos uma redução das áreas das frações "a" nas proporções aproximadas de 40 e 70% respectivamente. A fração "b" na dose de 2.000 Gy apresentou uma redução por volta de 50% em relação ao não irradiado. As frações "c"

das doses de 1.500 e 2.000 Gy, sofreram um aumento estimado de 50 e 30% respectivamente, em relação ao não irradiado. As diferentes proporções encontradas provavelmente são conseqüências das precipitações observadas. Por outro lado, pela tabela 4 podemos verificar que não ocorreram variações significativas nos coeficientes de partição, confirmando a manutenção do tamanho molecular das proteínas⁴¹.

No espectro de absorção na região ultravioleta (figura 11) podemos observar que ocorreu um aumento de absorção na região de 230 a 350 nm à medida que se aumentou a dose de radiação, assim como ocorreu a diminuição da diferença entre o pico de absorção máxima e mínima, em 280 e 250 nm, respectivamente, ilustrada na tabela 5. Estes resultados são similares aos obtidos por Baride e colaboradores⁵ nas soluções de venenos de *Naja naja*, *B. charuleus*, *E. carinatus* e *V. russelli*, os quais indicam u'a maior exposição dos grupos cromóforos, possivelmente devido aos desdobramentos das cadeias polipeptídicas.

Nas amostras, as enzimas caseinolíticas, dosadas para verificar a manutenção do poder catalítico, continuam presentes, mesmo naquela submetida à dose de 2.000 Gy. Observou-se a manutenção da proporcionalidade entre a concentração correspondente de tripsina e a concentração proteica, indicadas na tabela 6.

Por outro lado, nos venenos de *Botrops atrox* e *Lachesis muta*, submetidos a dose de 1.000 Gy, a seco, a radio-sensibilidade das atividades enzimáticas em ordem crescente é: exonucleásica, fosfolipásica, proteolítica (caseinolítica), esterásica, enzima trombina-símile, fibrinolítica³². De modo que observando os resultados acima do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nota-se que este grupo de enzimas também está entre os mais radio-resistentes.

Os vários experimentos realizados com a parte solúvel do vene

no, em cloreto de sódio 0,15 %, tiveram como objetivo principal verificar o comportamento desta face a radiação, em termos de possíveis alterações estruturais significativas nos seus constituintes. As determinações de grupos sulfidrílicos, eletroforese em gel de poliacrilamina (EGPA-SDS), cromatografia por exclusão molecular, absorção na região ultravioleta e enzimas caseinolíticas, sugerem que nas doses estudadas os componentes sofrem modificações discretas, que são diretamente proporcionais à dose de radiação recebida.

Após termos uma noção do comportamento do veneno, testamos sua capacidade antigênica, baseados na especificidade da reação antígeno-anticorpo²⁴, pela imunodifusão e imunoprecipitação. O método de imunodifusão dupla radial descrito por Ouchterlony^{46,47}, permite comparar vários antígenos contra o mesmo sistema de anticorpos, assim como o método de imunoprecipitação³⁴ auxilia na visualização da homologia entre os antígenos^{2,7,68}.

Observando as linhas de precipitação nas figuras 12 a 16, verificamos que as linhas remanescentes mantêm a identidade com o veneno não irradiado, até a dose de 2.000 Gy, porém nas doses acima de 750 Gy, essas se tornam menos intensas e difusas com o aumento da dose de radiação.

No que diz respeito à imunoprecipitação, para possibilitar uma comparação entre as curvas representadas nas figuras 17 a 24, foi necessário obter uma reta pela transformação logística, para então aplicarmos o teste F nos coeficientes angulares e lineares (tabela 7). Na tabela 8 encontramos os parâmetros utilizados nos cálculos de " F_a " e " F_b ", para verificar o paralelismo e a coincidência, respectivamente, entre as retas. Com os valores de " F_a ", " F_b " e os " F crítico" da tabela 9, foi possível verificar que as amostras irradiadas com 100, 250 e 500 Gy tiveram os coeficientes angulares irradiadas com 750, 1.000 e 1.500 Gy, embora as

curvas sejam paralelas, houve necessidade do aumento de concentração do veneno para obter o mesmo valor de absorvância. Na dose de 2.000 Gy podemos verificar que houve uma mudança brusca no comportamento da curva.

Por esses métodos, concluímos que a antigenicidade das proteínas presentes na solução não são alteradas até a dose de 500 Gy. Nas doses de 750, 1.000 e 1.500 Gy, embora ocorra reconhecimento dos antígenos pelo anticorpo, nota-se modificações nesta interação. Já na dose de 2.000 Gy a formação do complexo está bastante alterada.

Os resultados obtidos "in vitro" foram complementados pela avaliação da atividade tóxica. A DL₅₀ do veneno não irradiado, via intraperitoneal, em camundongos machos foi de 203 ± 3 µg/kg e 173 ± 17 µg/kg. Estes resultados concordam com os valores encontrados por Brazil⁹, cuja DL₅₀ situa-se entre 135,7 e 209,85 µg/kg, embora estes tenham sido avaliados pela via intravenosa, sem distinção de sexo.

Como podemos observar pela tabela 10 há aumento de cerca de 1,6; 2,4; 2,7 e 4,6 vezes da DL₅₀ em machos, em comparação a amostra não irradiada, nas amostras de 750, 1.000, 1.500 e 2.000 Gy, respectivamente. Também foi possível verificar um aumento de aproximadamente 1,7 e 3,1 vezes da DL₅₀ em fêmeas, em comparação a amostra não irradiada, nas amostras de 500 e 1.000 Gy respectivamente, e que não há alterações significativas nas amostras de 100 e 250 Gy.

Embora tenha sido observado variação na resposta entre grupos de camundongos machos e fêmeas, esta não é relevante para verificação da redução da toxicidade determinada. Cabe aqui citar uma das conclusões obtidas por Rosa e colaboradores³⁶, "A DL₅₀ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Lautenti, 1763), de coloração branca, crotamino-positivo, pode ser determinada através de inoculações, por via intravenosa, em camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758 - de 18 a 22 g, sem distinção de sexo".

Desta forma, foi possível verificar que com o aumento da dose de radiação há aumento da DL_{50} do veneno de cascavel, em camundongos.

Pela somatória dos resultados obtidos "in vitro" e de redução de toxicidade "in vivo", podemos concluir que as respostas do veneno crocotalico frente à radiação gama seguem os mesmos padrões das diferentes peçonhas, já citados, submetidos ao mesmo processo físico. Desta forma podemos supor que também ocorra um paralelo quanto sua imunogenicidade, possibilitando a utilização deste processo na obtenção de anticorpos.

Como complemento, também podemos citar alguns parâmetros verificados no estudo das toxinas de cascavel isoladas. Souza e colaboradores^{63,64} submeteram a crotocina em solução a diferentes doses de radiação ^{60}Co , observando que nas doses de 250 e 500 Gy, não ocorrem variações significativas nas concentrações, antigenicidades e doses letais 50%, em camundongos. Nas doses de 1.000 e 1.500 Gy foram observadas precipitações de 15 e 40%, respectivamente, além do aumento da DL_{50} de 2,0 e 3,5 vezes nas amostras em relação a toxina não irradiada. Em 2.000 Gy, 65% das proteínas presentes na solução precipitaram, sendo que as remanescentes apresentaram grandes modificações. A crotamina irradiada, estudada por Costa e colaboradores^{18,19,20}, não mostrou alterações na antigenicidade e no perfil eletroforético, quando submetida a dose de 100 Gy; porém na dose de 2.000 Gy a autora observou mudanças no perfil eletroforético, além da perda da capacidade antigênica. Desta forma, encontramos um paralelo entre o comportamento de soluções das toxinas isoladas e o veneno total, quando o submetemos à radiação gama.

Estudando toxinas isoladas, Han: hiro e colaboradores³¹ observaram que a fosfolipase A (subunidade da crotocina) foi capaz de induzir a produção de anticorpos com capacidade de neutralizar o veneno total "in vitro". Recentemente, Santos e colaboradores⁵⁹ concluíram que imunidade

induzida pela fosfolipase A₂, resulta na produção de anticorpos capazes de neutralizar o efeito letal do veneno *C. d. terrificus*, em camundongos. Esta seria uma forma tentativa de se obter soro anticrotálico.

Considerando que este trabalho é um estudo preliminar para a obtenção de antígenos atóxicos para a produção de soros pela atenuação do veneno total, sugerimos que o próximo passo seja de testar as amostras ir radiadas em animais de laboratório, com o intuito de avaliar o anticorpo produzido. Para tal, inicialmente propomos a utilização da faixa de dose entre 750 e 1.000 Gy, onde pudemos notar menor variação estrutural com a detoxicação do mesmo. Posteriormente, testar também doses iguais ou acima de 2.000 Gy, onde já observamos alterações na antigenicidade, baseados no estudo de Puranananda⁴⁹, no qual observou-se que mesmo as amostras onde as características antigênicas não puderam ser detectadas pela immodi fusão, elas foram capazes de induzir a produção de anticorpos, que são efetivos na proteção contra o veneno homólogo, em camundongos.

Tabela 1 - Condições iniciais para o teste da DL₅₀

Amostra	Carundongos		Concentração de S1 ($\mu\text{g/ml}$)
	sexo	peso(g)	
NI	M	(21 \pm 1)	(35 \pm 1)
750	M	(24 \pm 1)	(97 \pm 2)
1.000	M	(21 \pm 1)	(107 \pm 1)
1.500	M	(24 \pm 1)	(184 \pm 6)
2.000	M	(27 \pm 1)	(282 \pm 6)
NI	F	(21 \pm 1)	(34 \pm 3)
100	F	(24 \pm 1)	(37 \pm 4)
250	F	(24 \pm 1)	(53 \pm 4)
500	F	(21 \pm 1)	(66 \pm 6)
1.000	F	(21 \pm 1)	(108 \pm 11)

NI = amostra não irradiada

Tabela 2 - Determinação da concentração protéica

Amostra	Absorvância	Concentração ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)	Diluição	Conc. corrigida $\mu\text{g}/\text{ml}$	% relativa
NI	(0,212 \pm 0,003)	(53 \pm 1)	1:8	(2120 \pm 40)	100
100	(0,217 \pm 0,004)	(54 \pm 1)	1:8	(2160 \pm 40)	102
250	(0,212 \pm 0,003)	(53 \pm 1)	1:8	(2120 \pm 40)	100
500	(0,206 \pm 0,004)	(51 \pm 1)	1:8	(2040 \pm 40)	96
750	(0,351 \pm 0,004)	(87 \pm 1)	1:4	(1740 \pm 20)	82
1.000	(0,323 \pm 0,003)	(80 \pm 1)	1:4	(1600 \pm 20)	75
1.500	(0,260 \pm 0,008)	(65 \pm 2)	1:4	(1300 \pm 40)	61
2.000	(0,199 \pm 0,004)	(49 \pm 1)	1:4	(980 \pm 20)	46

NI = amostra não irradiada

Tabela 3 - Áreas dos principais picos de absorção

Amostra	Pico "a" área	Pico "b" área	Pico "c" área
NI	(2527 ± 130)	(640 ± 76)	(433 ± 63)
100 Gy	(2459 ± 200)	(804 ± 82)	(391 ± 58)
250 Gy	(2475 ± 224)	(707 ± 92)	(403 ± 72)
500 Gy	(2236 ± 147)	(520 ± 50)	(315 ± 42)
750 Gy	(2273 ± 177)	(861 ± 74)	(513 ± 59)
1.000 Gy	(1643 ± 227)	(638 ± 147)	(395 ± 121)
1.500 Gy	(1526 ± 162)	(731 ± 120)	(643 ± 114)
2.000 Gy	(822 ± 102)	(318 ± 87)	(781 ± 126)

Tabela 4 - Coeficiente de partição dos principais picos

Amostra	Pico "a" Kav	Pico "b" Kav	Pico "c" Kav
NI	(0,33 ± 0,02)	(0,73 ± 0,03)	(0,84 ± 0,04)
100 Gy	(0,33 ± 0,02)	(0,71 ± 0,03)	(0,82 ± 0,04)
250 Gy	(0,33 ± 0,02)	(0,70 ± 0,03)	(0,82 ± 0,04)
500 Gy	(0,36 ± 0,04)	(0,72 ± 0,05)	(0,86 ± 0,06)
750 Gy	(0,36 ± 0,04)	(0,73 ± 0,05)	(0,86 ± 0,06)
1.000 Gy	(0,37 ± 0,04)	(0,72 ± 0,06)	(0,86 ± 0,07)
1.500 Gy	(0,35 ± 0,04)	(0,71 ± 0,06)	(0,86 ± 0,06)
2.000 Gy	(0,34 ± 0,02)	(0,77 ± 0,04)	(0,90 ± 0,04)

NI = amostra não irradiada

Tabela 5 - Absorvância no pico máximo e mínimo na Região U.V.

Amostra	Absorvância max . (280 nm)	Absorvância min . (250 nm)	Δ Absorvância
NI	0,640	0,350	0,290
100	0,640	0,375	0,265
250	0,655	0,395	0,260
500	0,655	0,425	0,230
750	0,680	0,480	0,200
1.000	0,730	0,520	0,210
1.500	0,745	0,545	0,200
2.000	0,780	0,595	0,185

NI = amostra não irradiada

Tabela 6 - Concentrações correspondentes de tripsina nas amostras

Amostra	Absorvância	Conc. tripsina ($\mu\text{g}/0,9 \text{ ml}$)	Conc. tripsina corrigida ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
NI	$(0,248 \pm 0,005)$	$(3,3 \pm 0,1)$	$(1,7 \pm 0,1)$
100	$(0,223 \pm 0,003)$	$(2,9 \pm 0,1)$	$(1,5 \pm 0,1)$
250	$(0,237 \pm 0,002)$	$(3,1 \pm 0,3)$	$(1,6 \pm 0,1)$
500	$(0,203 \pm 0,006)$	$(2,7 \pm 0,1)$	$(1,4 \pm 0,1)$
750	$(0,198 \pm 0,020)$	$(2,6 \pm 0,3)$	$(1,6 \pm 0,1)$
1.000	$(0,163 \pm 0,002)$	$(2,1 \pm 0,1)$	$(1,5 \pm 0,1)$
1.500	$(0,138 \pm 0,011)$	$(1,8 \pm 0,2)$	$(1,6 \pm 0,1)$
2.000	$(0,119 \pm 0,017)$	$(1,6 \pm 0,2)$	$(1,8 \pm 0,3)$

Tabela 7 - Coeficientes angulares e lineares das retas de imunoprecipitação

Amostra	Coef. Angular <u>A</u>	Coef. Linear <u>B</u>
NI	$(0,014 \pm 0,002)$	$(-6,672 \pm 0,568)$
100	$(0,014 \pm 0,003)$	$(-6,780 \pm 0,702)$
250	$(0,015 \pm 0,002)$	$(-7,190 \pm 0,605)$
500	$(0,016 \pm 0,002)$	$(-7,668 \pm 0,537)$
750	$(0,017 \pm 0,002)$	$(-8,075 \pm 0,460)$
1.000	$(0,017 \pm 0,002)$	$(-8,632 \pm 0,511)$
1.500	$(0,017 \pm 0,002)$	$(-8,999 \pm 0,388)$
2.000	$(0,032 \pm 0,004)$	$(-14,403 \pm 0,997)$

NI = amostra não irradiada

Tabela 3 - Parâmetros utilizados nos cálculos de F_a e F_b

Amostras	Modelo	GL	SQR	QMP
NI	MC	16	13,332	0,833
e	MR	17	13,343	0,785
100 Gy	MZ	18	13,344	0,741
NI	MC	16	11,264	0,704
e	MR	17	11,395	0,670
250 Gy	MZ	18	11,592	0,644
NI	MC	16	9,982	0,624
e	MR	17	10,297	0,606
500 Gy	MZ	18	11,554	0,642
NI	MC	16	8,729	0,546
e	MR	17	9,342	0,550
750 Gy	MZ	18	11,878	0,660
NI	MC	16	9,545	0,597
e	MR	17	10,471	0,616
1.000 Gy	MZ	18	16,641	0,925
NI	MC	16	7,735	0,483
e	MR	17	8,328	0,490
1.500 Gy	MZ	18	21,905	1,217
NI	MC	16	21,532	1,346
e	MR	17	43,094	2,535
2.000 Gy	MZ	18	109,094	6,061

Tabela 9 - Valores de F_a e F_b

Amostras	F_a	F_b
NI e 100 Gy	0,01	0,00
NI e 250 Gy	0,19	0,29
NI e 500 Gy	0,51	2,07
NI e 750 Gy	1,12	4,61
NI e 1.000 Gy	1,55	10,02
NI e 1.500 Gy	1,23	27,71
NI e 2.000 Gy	16,02	26,04
F crítico	$F_{1,16} = 4,49$	$F_{1,17} = 4,45$
Grau de liberdade	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,05$
NI = amostra não irradiada		

Tabela 10 - Toxicidade das amostras não irradiadas (NI) e irradiadas

amostra diluição		% de Mortalidade									
		MACHOS					FEMEAS				
		NI	750 Gy	1.000 Gy	1.500 Gy	2.000 Gy	NI	100 Gy	250 Gy	500 Gy	1.000 Gy
SI = 1:1	100	93	100	100	100	100	100	100	100	100	
1:1,33	83	92	89	100	100	75	100	100	100	100	
1:1,78	33	78	83	100	83	57	67	78	100	60	
1:2,37	11	57	20	67	40	14	29	63	25	17	
1:3,16	8	14	0	33	0	0	11	29	0	0	
LD ₅₀ (µg/Kg)	207 ± 3	324 ± 4	492 ± 5	561 ± 18	942 ± 20	173 ± 17	152 ± 17	167 ± 14	291 ± 27	540 ± 56	

Nas figuras que se seguem as amostras estão identificadas com a seguinte numeração:

- 1 - Veneno não irradiado
- 2 - Veneno irradiado com 100 Gy
- 3 - Veneno irradiado com 250 Gy
- 4 - Veneno irradiado com 500 Gy
- 5 - Veneno irradiado com 750 Gy
- 6 - Veneno irradiado com 1.000 Gy
- 7 - Veneno irradiado com 1.500 Gy
- 8 - Veneno irradiado com 2.000 Gy



Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo com SDS, corada com nitrato de prata. As amostras foram pré-tratadas com uréia e beta-mercaptoetanol

Nas figuras 2 a 6, as condições de cromatografia por exclusão molecular foram as seguintes:

- Gel Sephadex G-75 fino
- Dimensões da coluna: 0,9 x 88,0 cm
- Volume da amostra: 1 ml (500 µg)
- Forma coletadas frações de 1,1 ml/tubo
- Fluxo: 0,2 ml/h
- Efluentes: Tampão fosfato 0,05 M, pH 6,5 com 0,15 M de cloreto de sódio
- Temperatura: 5-8°C
- As amostras foram lidas tubo a tubo em 230 nm.

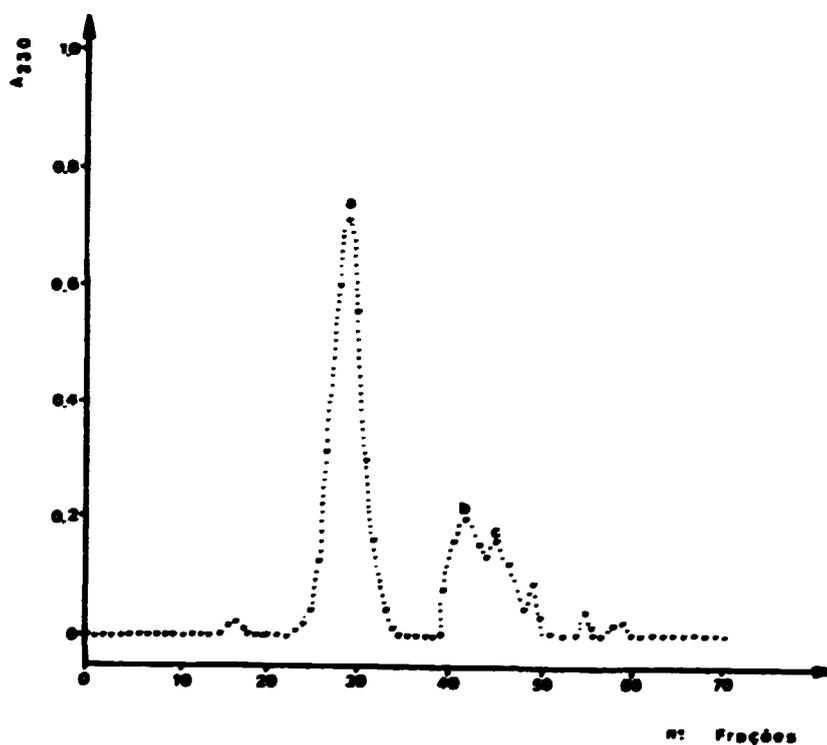


Figura 2 - Perfil cromatográfico da amostra não irradiada

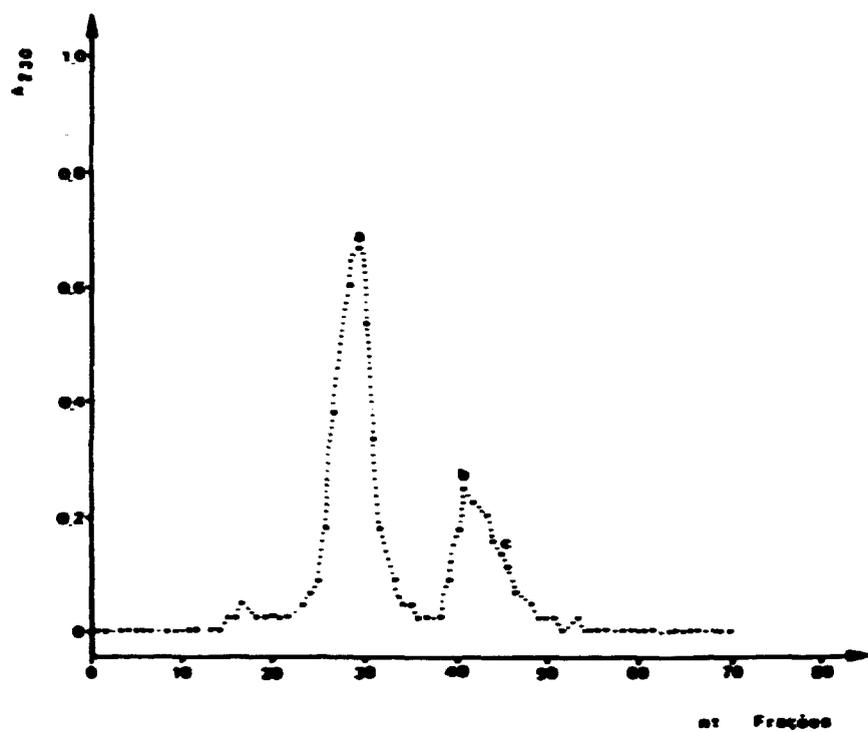


Figura 3 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 100 Gy

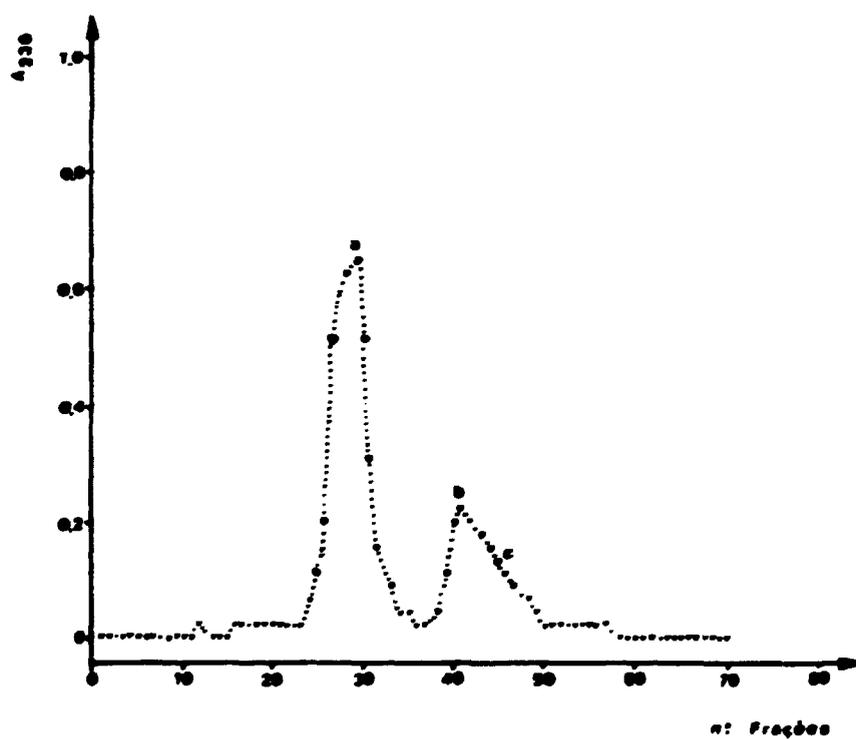


Figura 4 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 250 Gy

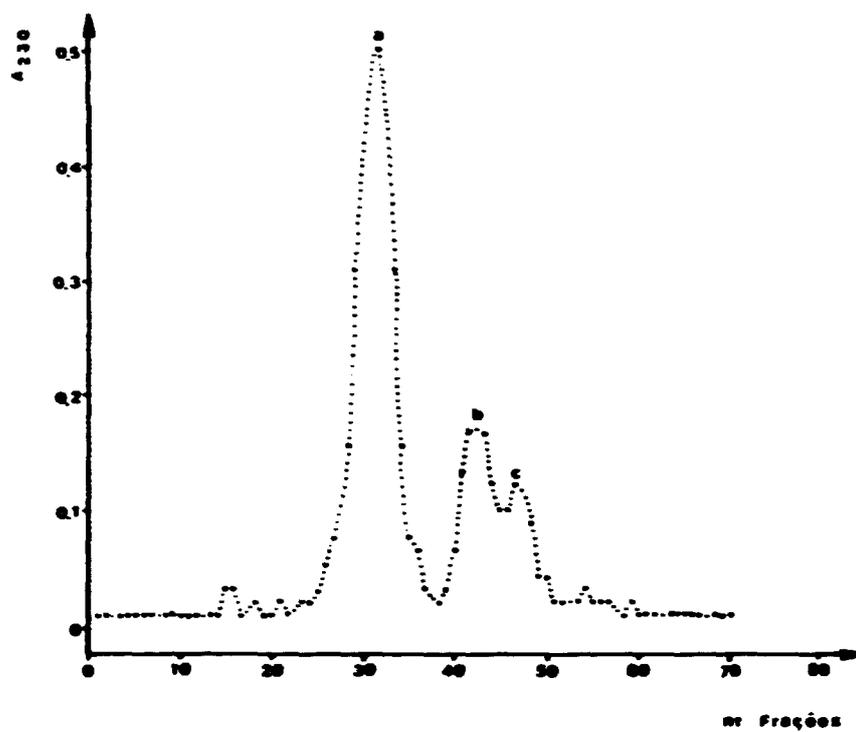


Figura 5 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 500 Gy

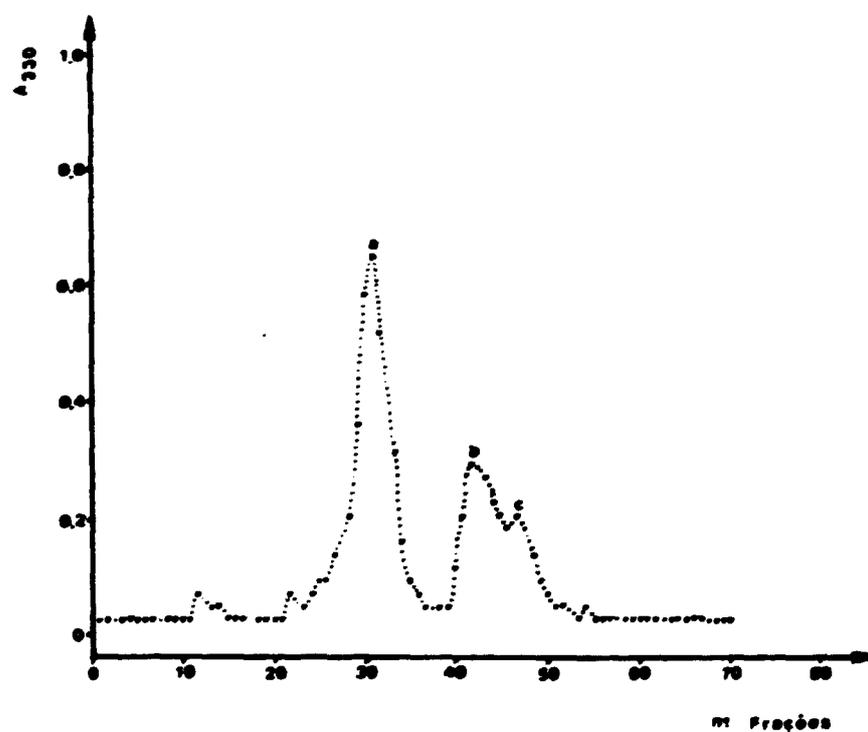


Figura 6 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 750 Gy

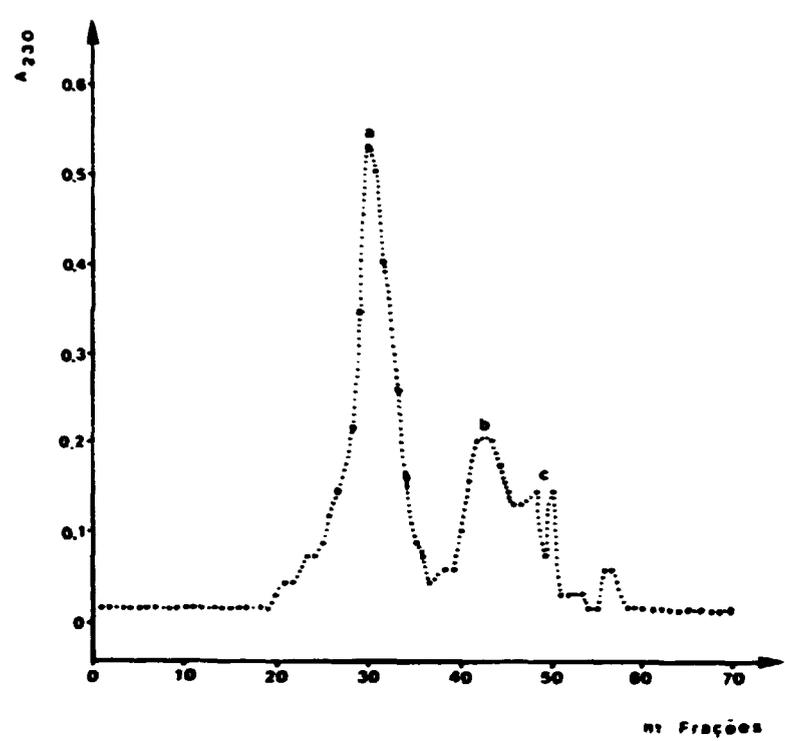


Figura 7 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 1.000 Gy

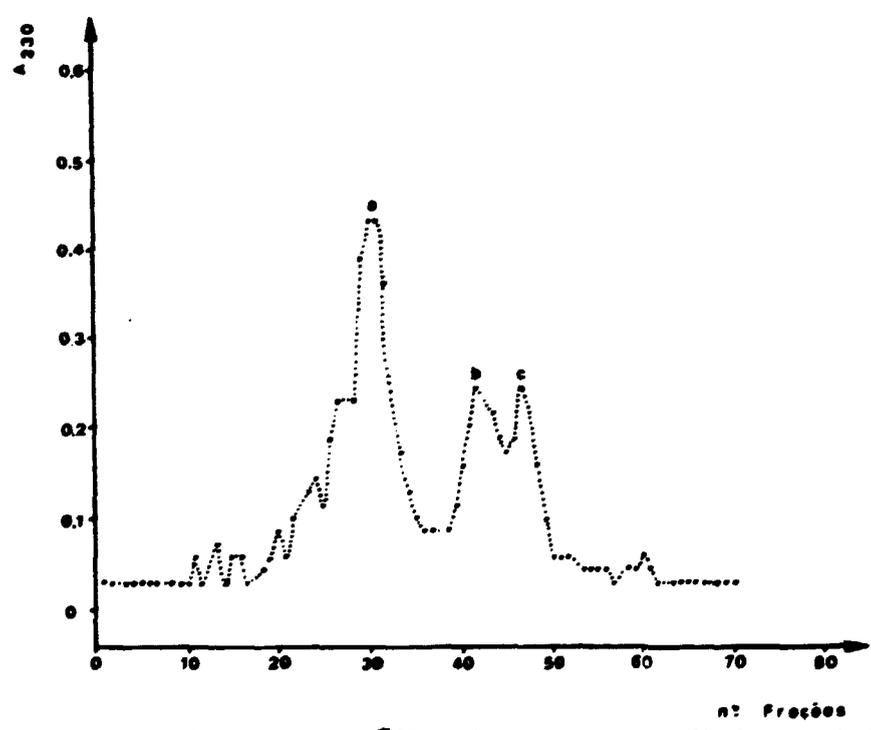


Figura 8 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 1.500 Gy

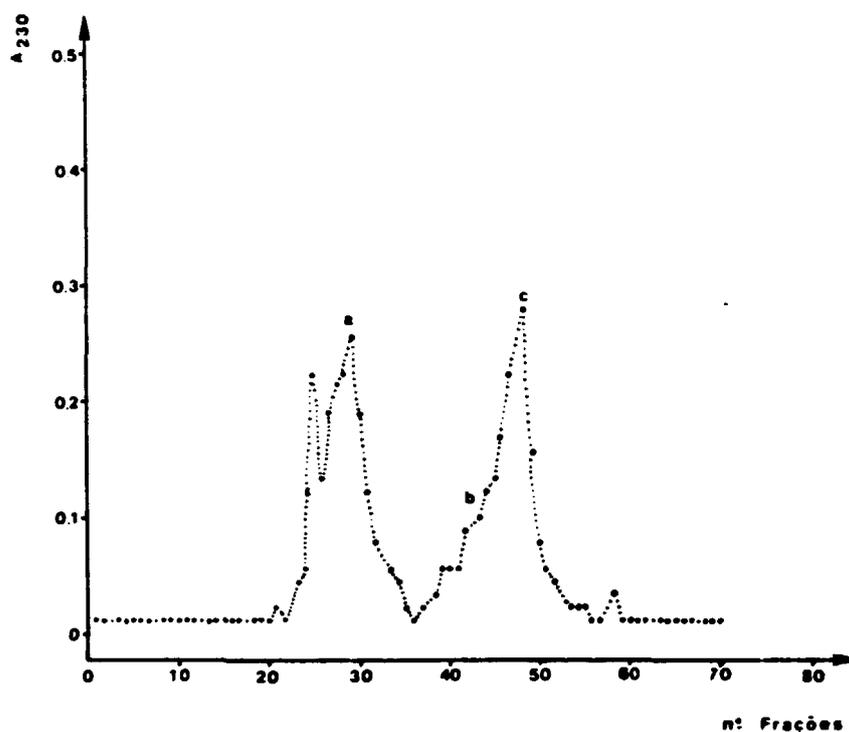


Figura 9 - Perfil cromatográfico da amostra irradiada com 2.000 Gy

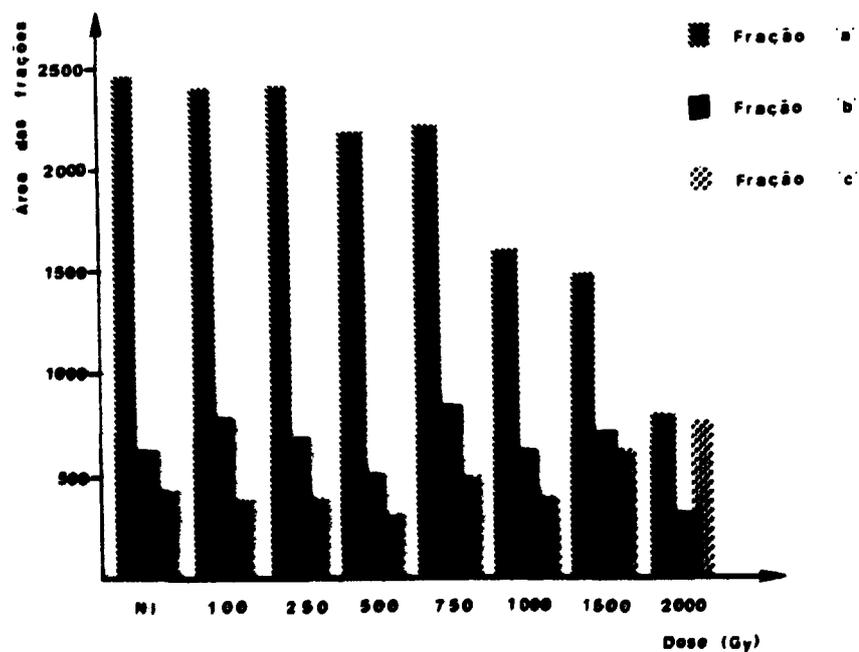


Figura 10 - Área das três principais frações dos perfis cromatográficos, do veneno de cascavel em 230 nm, das amostras não irradiadas (NI) e submetidas às várias doses de radiação gama, estimadas pelo Programa "Analysis" 69

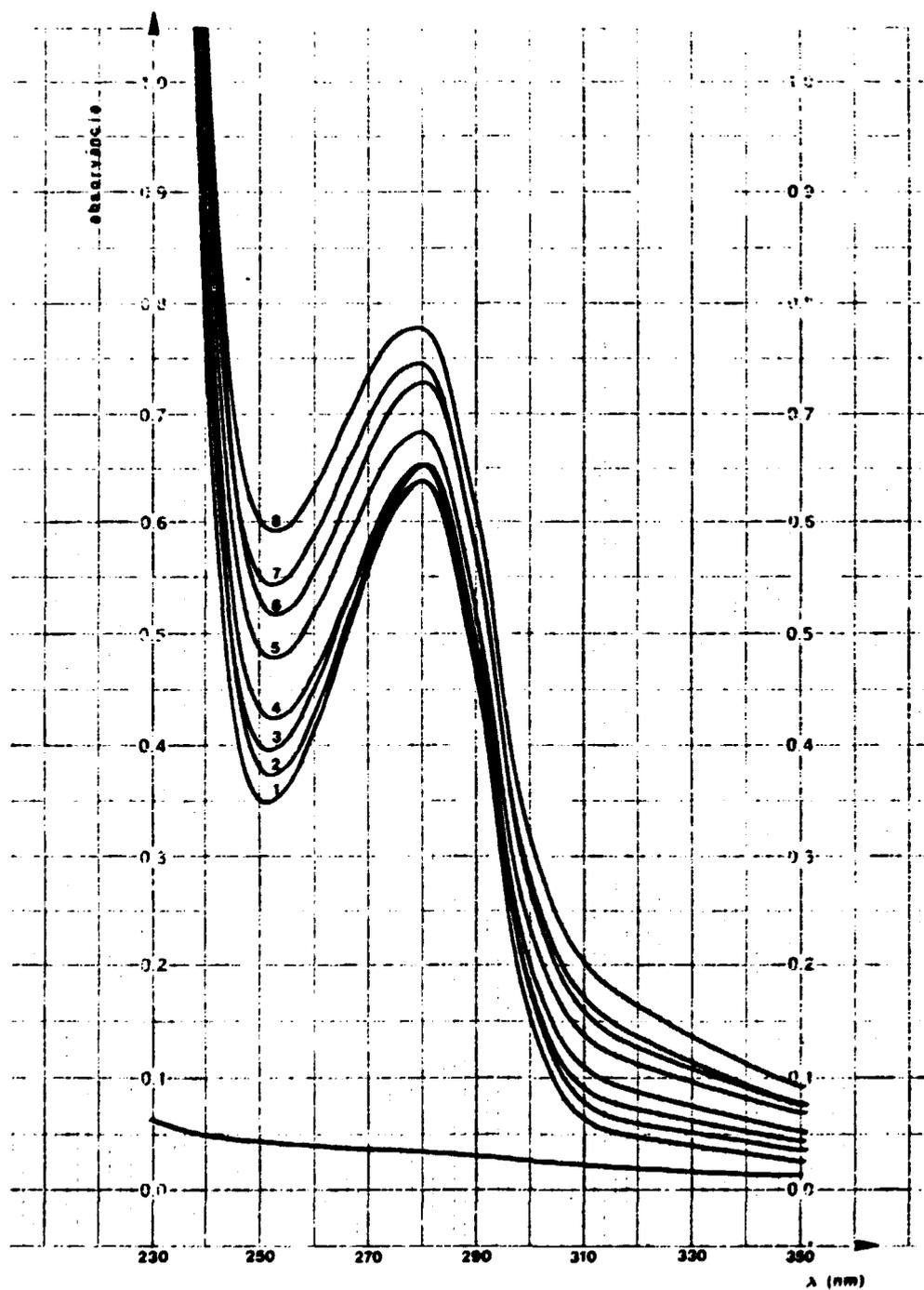


Figura 11 - Espectro de absorção na região ultravioleta de amostras de veneno crotálico em solução de NaCl 0,15 M, na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. Na leitura do espectro utilizou-se o intervalo de absorvância de 0 a 1,0, com uma variação de comprimento de onda (λ) de 0,5 nm/segundo, entre 240 e 350 nm. A velocidade do papel foi de 20 nm/polegada.

Os resultados de imunodifusão dupla radial representadas nas figuras 12 a 16, foram obtidos em lâminas com agarose 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. As lâminas após lavagem e secagem, foram coradas com Negro de Amido. O soro anticrotálico está representado por S.

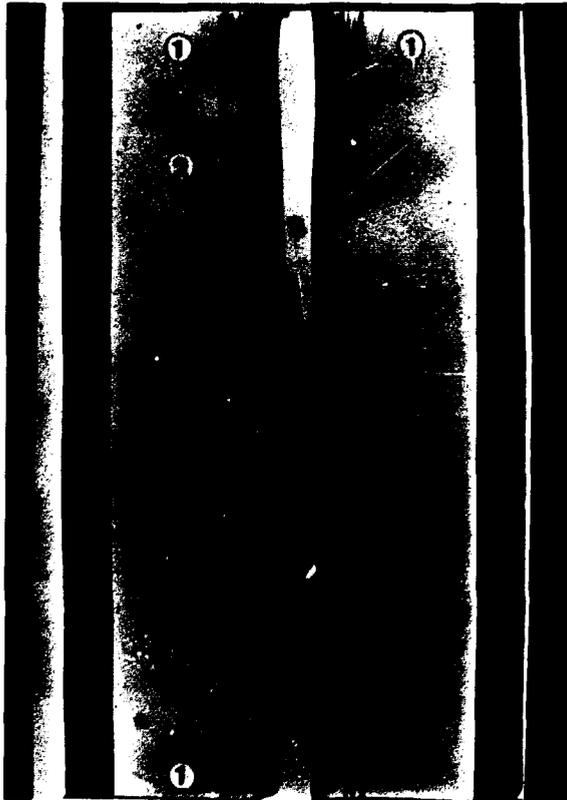
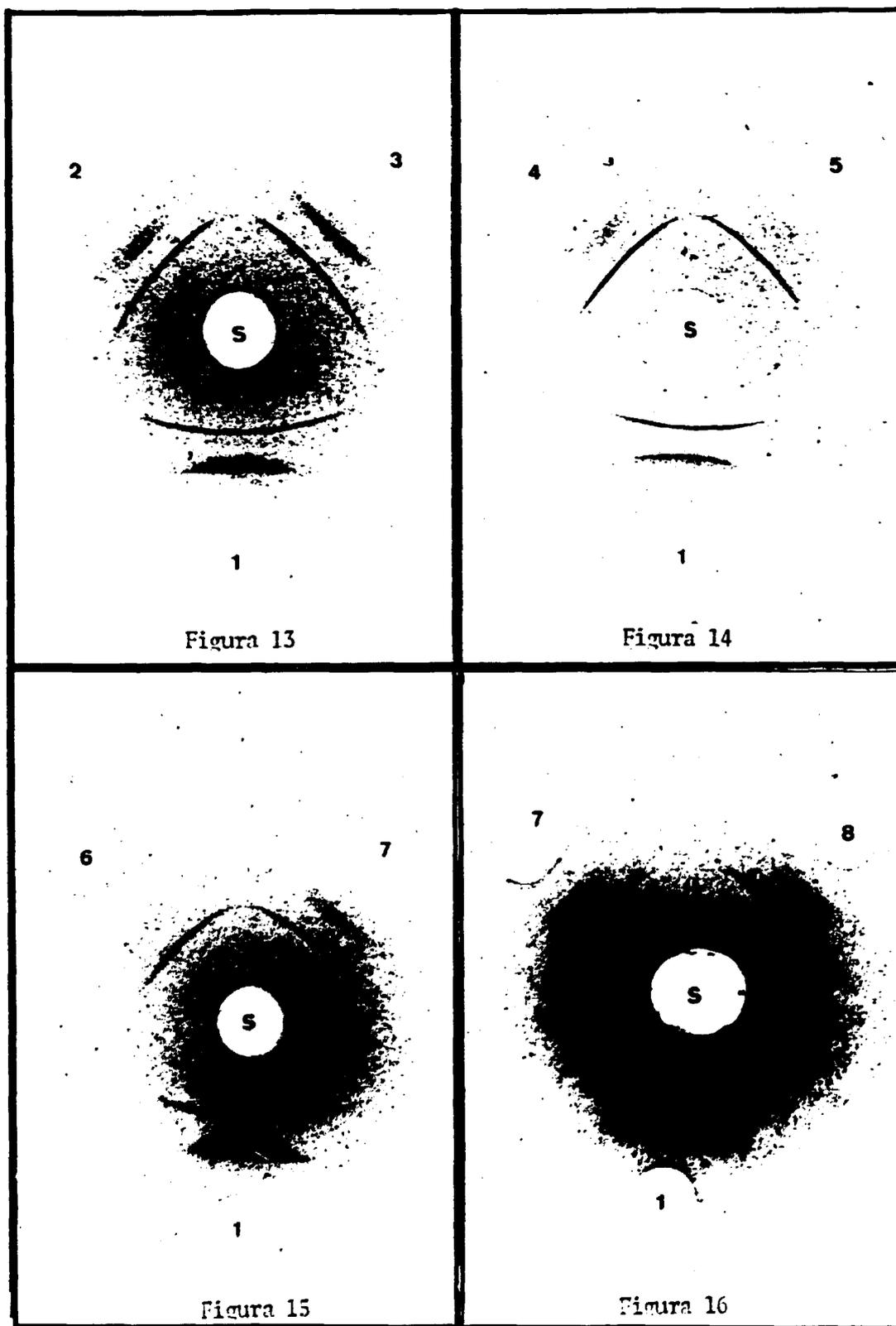


Figura 12 - Imunodifusão dupla radial dos sobrenadantes das amostras ir radiadas ou não



Figuras 13 a 16 - As amostras na concentração de 600 $\mu\text{g/ml}$ foram analisadas frente ao soro anticrotálico

As curvas de imunoprecipitação representadas nas figuras 17 e 24 mostram os produtos de interação dos venenos irradiados ou não com o soro anticrotálico. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C e mais 24 horas a 0°C. Os precipitados foram dissolvidos em hidróxido de sódio 0,1 N e lidos em 280 nm.

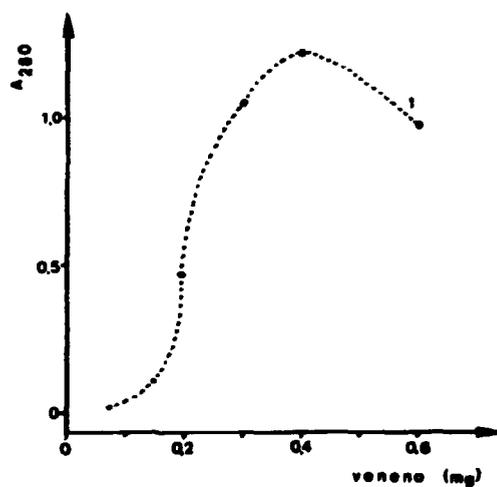


Figura 17 - Curva de imunoprecipitação da amostra não irradiada

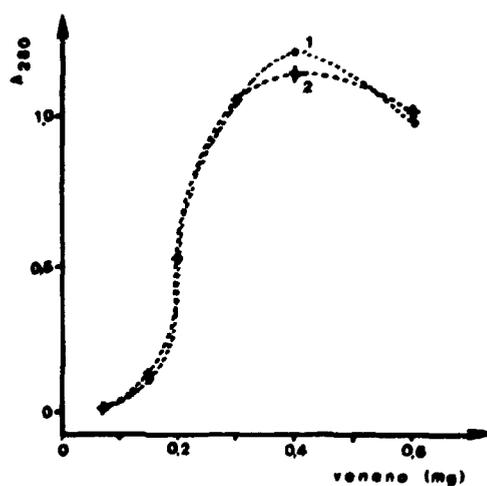
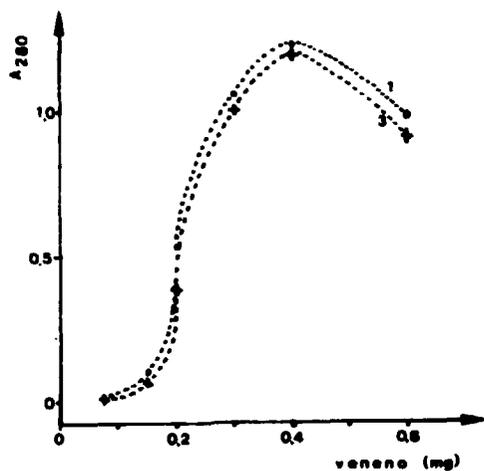
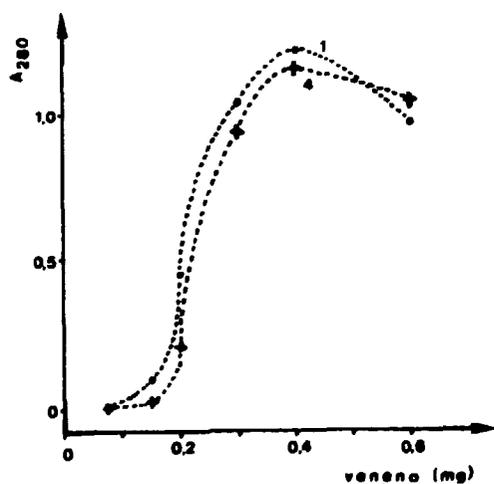


Figura 18 - Curvas de imunoprecipitação das amostras: 1 - não irradiada; 2 - irradiada 100 Gy



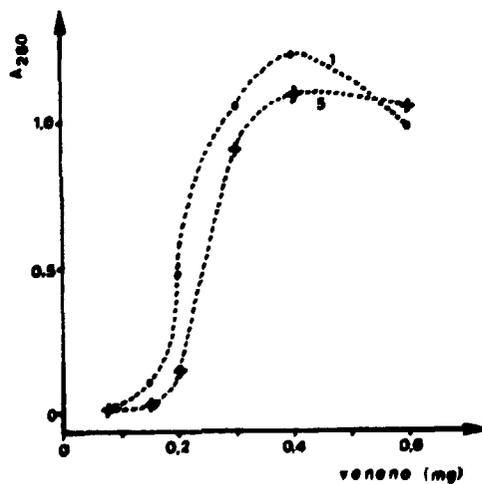
Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada;
3 - irradiada 250 Gy

Figura 19



Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada;
4 - irradiada 500 Gy

Figura 20



Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada
5 - irradiada 750 Gy

Figura 21

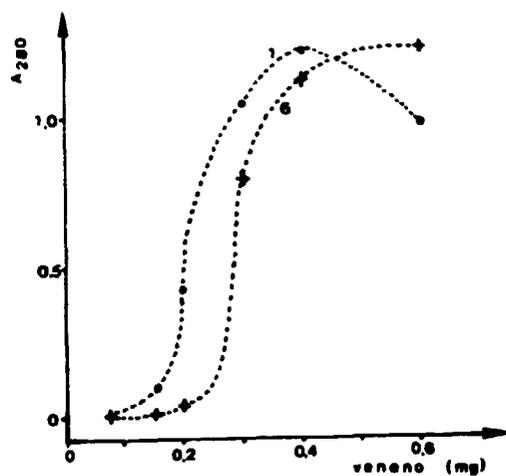


Figura 22

Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada
6 - irradiada 1.000 Gy

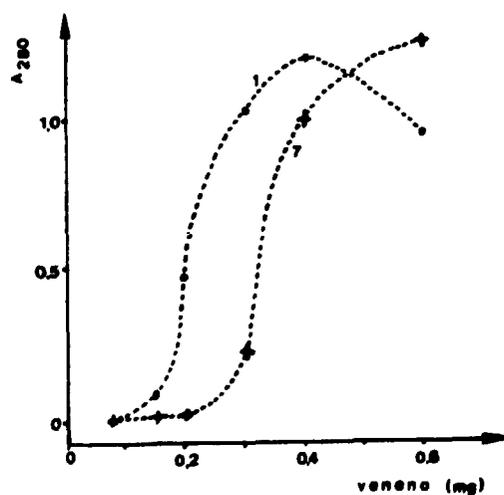


Figura 23

Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada
7 - irradiada 1.500 Gy

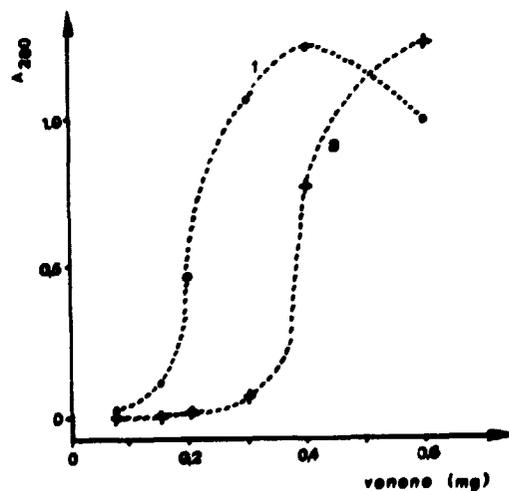


Figura 24

Curvas de imunoprecipitação
das amostras:
1 - não irradiada
8 - irradiada 2.000 Gy

V. CONCLUSÕES

Nas amostras de *Crotalus durissus terrificus* irradiadas em fonte de ^{60}Co , em soluções de 2 mg/ml de cloreto de sódio 0,15 M, a temperatura ambiente, sob pressão atmosférica, concluímos que:

- Nas doses de 100, 250 e 500 Gy não há alterações bioquímicas, antigênicas e tóxicas significativas.
- Há diminuição de toxicidade com manutenção da antigenicidade nas doses de 750 e 1.000 Gy.
- Nas doses de 1.500 e 2.000 Gy há modificações bioquímicas e antigênicas significativas, com perda parcial da toxicidade.
- A irradiação é uma técnica promissora na obtenção do veneno de cascavel atenuado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMARAL, A. Serpentes do Brasil. Iconografia colorida. São Paulo Melhoramentos, 1977.
- 2 - ARANTES, J.B.; KAPLAN, G.; BIER, O.G. Emprego da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. Mem. Inst. Butantan, 18:21-6, 1944/45.
- 3 - ATALLA, L.T. Interpretação quantitativa de resultados experimentais. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, maio 1978. (IEA-Inf-60).
- 4 - BANCHIER, W.; ROSA, R.R.; FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus-musculus* Linnaeus, 1758. Mem. Inst. Butantan, 37:139-48, 1973.
- 5 - BARIDE, R.M.; JAIN, S.D.; GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. Indian J. Med. Res., 72:571-6, 1980.
- 6 - BARRADIN, H.; MARTIARENA, J.L.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSENBERG, P., ed. Toxins: Animal, plant and microbial. Oxford, Pergamon, 1978. p.133.
- 7 - BIER, O.G. Estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o antiveneno crotálico. Mem. Inst. Butantan, 18:27-32, 1944/45.
- 8 - BON, C.; RADVANYI, F.; SALIOV, B.; FAURE, G. Crotoxin: A Biochemical Analysis of its mode of action. J. Toxicol. Toxin Rev., 5(2):125-38, 1986.

- 9 - BRAZIL, O.V. Neurotoxins from the South American Rattlesnake venom. J. Formosan Med. Assoc., 71:394-400, 1972.
- 10 - BRAZIL, O.V. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Assoc. Med. Bras., 26(6):212-8, 1980.
- 11 - BREITHAUPT, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotafotin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 292:271-8, 1976.
- 12 - BUSSAB, W.O. Análise de variância e de regressão. São Paulo, Atual Editora, 1986. p.92-100.
- 13 - BUTTER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24(314):273-82, 1984.
- 14 - CAVILLO, M.A.P. Purificação do hormônio de crescimento humano. Isolamento da variante 22K. Ensaio de atividade biológica e radioimunológica. São Paulo, 1985. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 15 - CANTOR, C.R. & SCHEMEL, P.R. Biophysical chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function. New York, Academic, 1980.
- 16 - CHANDERKAR, L.P.; GURNANI, S.; NADKARNI, G.B. The involvement of aromatic amino acids in biological activity of bovine fibrinogen as assessed by gamma-irradiation. Radiat. Res., 65:283-91, 1976.
- 17 - CHOI, S.C. Introductory applied statistics in science. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 1978. p.123-159.

- 18 - COSTA, T.A. Efeitos da radiação ionizante na crotarina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1983. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 19 - COSTA, T.A. & ROGERO, J.R. Dano da radiação gama em crotarina (Toxina da cascavel brasileira). São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1988. (Publicação IPEN 151).
- 20 - COSTA, T.A. & ROGERO, J.R. Efeitos dos produtos de radiólise da água na crotarina (Toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*). São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1988. (Publicação IPEN 142).
- 21 - 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. Brazilian J. Med. Biol. Res., 20:713-20, 1987.
- 22 - ELLMAN, G.L. Tissue Sulphydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82: 70-7, 1959.
- 23 - FAURE, G. & BON, C. Crotoxin, a Phospholipase A₂ Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. Biochemistry, 27(2):730-8, 1988.
- 24 - FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; COPPIVAZ, C.A. Imunologia. São Paulo, Edgar Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1977. p.54-116.
- 25 - FRAENKEL-CONTRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. Arch. Biochem. Biophys., 60:64, 1956.
- 26 - GRALEN, N. & SVEDEBERG, T. The molecular weight crotoxin. Biochem. J., 32:1375-7, 1938.

- 27 - HABERMANN, E. & BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex. An example of biochemical and pharmacological protein complementation. Toxicon, 16:19-30, 1978.
- 28 - HABERMANN, E.; WALSCH, P.; BREITHAUPT, H. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 273:313-30, 1972.
- 29 - HAVES, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAVES, B.D. & RICK MOOD, D., eds. Gel electrophoresis of proteins. Eynsham, Information Printing, 1981. p.1-51.
- 30 - HAMPE, O.G.; VOZARI-HAMPE, M.M.; GONÇALVES, J.M. Crotoxin conformation: effect of pH and temperature. Toxicon, 16:453-60, 1978.
- 31 - HANASHIRO, M.A.; SILVA, M.H.; BIER, O.G. Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to Crotalus Phospholipase A. Immunochemistry, 15:745-50, 1978.
- 32 - HERRERA, E.; YARLEQUE, A.; CAIPOS, S.; ZAVALITA, A. Gamma radiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. Inf. Nucl., 3(1):1-14, 1986.
- 33 - HOPST, J.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. The active components of crotoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46:1042, 1972.
- 34 - KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Experimental immunochemistry. 2.ed. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, (s.d).
- 35 - KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, P.C.; GAITONDE, B.B. Irradiated cobra *Naja naja* venom for biomedical applications. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiosterilization of medical products: proceedings of a symposium on..., held in Bombay, 9-13 Dec. 1974. Vienna, 1975. p.253-62.

- 36 - NENITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol., 50:291-310, 1974.
- 37 - LAURE, C.J. Die primärstruktur des crotarins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356:213-5, 1975.
- 38 - LI, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Electrophoresis of crotoxin. J. Am. Chem. Soc., 64:1586, 1942.
- 39 - LONEY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-75, 1951.
- 40 - MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem., 31:964, 1959.
- 41 - MURATA, Y. & ROGERO, J.R. Análise cromatográfica por exclusão molecular em amostras de venenos de cascavel irradiadas com ^{60}Co . São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1983. (Publicação IPEV 154).
- 42 - MURATA, Y. & ROGERO, J.R. Effects of gamma radiation on *Crotalus durissus terrificus* venom: Antigenic aspects. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1988. (Publicação IPEV 153).
- 43 - MURATA, Y.; COSTA, T.A.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, J.N.; ROGERO, J.R. Effects of gamma radiation on *Crotalus durissus terrificus* venom. Arq. Biol. Tecnol., 30(1):106, 1987.
- 44 - NAKAZONE, A.K. Aspectos imunológicos da crotoxina e suas subunidades. São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Química, Universidade de São Paulo). (IEA-DT-112).

- 45 - NAKAZONE, A.K.; ROGERO, J.R.; CONÇALVES, J.M. Crotoxin I. Immunology and interaction of the subunits. Brazilian J. Med. Biol. Res., 17:119-28, 1984.
- 46 - OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5:1-78, 1958.
- 47 - OUCHTERLONY, O. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell Sci, 1967.
- 48 - PRADO-FRANCESCHI, J. & BRAZIL, O.V. Convulxin a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Toxicon, 19(6):875-87, 1981.
- 49 - PURAVANANDA, C. Studies on effects of radiations snake venoms with special aspects on their sterilization. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1972. (IAEA-R-661).
- 50 - RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a trombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Brazilian J. Med. Biol. Res., 19:333-8, 1986.
- 51 - RAY, A.A., ed. SAS user's guide: statistics, 1982 edition. Cary , North Caroline, SAS Institute, 1982.
- 52 - REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hygiene, 27(3):493-7, 1938.
- 53 - REIMERDES, E.H. & KLOSTERMEYER, H. Determination of Proteolytic activities on casein substrates. In: COLWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1976. p. 26-28.

- 54 - RODRIGUES, O.G. & SCANNONE, H.R. Fractionation of *Crotalus durissus cumanensis* venom by gel filtration. Toxicon, 14:400-3, 1976.
- 55 - ROGERO, J.R. Toxinas do veneno de *C. d. terrificus*. Interação proteína-proteína e cinética da troca-isotônica hidrogênio-trício. São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Química, Universidade de São Paulo). (IEA-DT-119).
- 56 - ROSA, R.P.; FURLANETTO, S.M.P.; VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL₅₀ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768), em *Mus musculus* (Linnaeus, 1758). Mem. Inst. Butantan, 37:131-7, 1973.
- 57 - ROSENFELD, G. Ação neurotóxica de venenos ofídicos (*crotalus* e *micrurus*) no sistema nervoso central. Interpretação clínica. In: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência: resumos da 23^a reunião anual, Curitiba, jul. 1971. Cienc. Cult. (São Paulo) Supl., 23:359, 1971.
- 58 - SALAFRANCA, E.S. Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 24(1):60, 1973.
- 59 - SANTOS, M.C.; DINIZ, C.R.; PACHECO, M.A.W.; SILVA, W.L. Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, 26(2):207-13, 1988.
- 60 - SCHENBERG, S. Análise da crotamina no veneno individual de cascaveis recebidos pelo Instituto Butantan. Mem. Inst. Butantan, 29:213-26, 1959.
- 61 - SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. Toxicon, 18:235-47, 1980.

- 62 - SILVERSTEIN, P.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1979. p.203-23.
- 63 - SOUSA Fº, J.N. & ROGERO, J.R. Efeitos da radiação gama em crotoxina (Toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*). São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1938. (Publicação IPEN 155).
- 64 - SOUSA Fº, J.N. & ROGERO, J.R. Effects of gamma radiation on isolated toxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jul. 1988. (Publicação IPEN 157).
- 65 - SWITZER, R.C.; MERRIL, C.R.; SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrilamide gels. Anal. Biochem., 98:231-7, 1979.
- 66 - TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M.; ADELINO, M.G.F. Fracionamento do veneno *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 27(3):115-22, 1985.
- 67 - TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A. The effect of Ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake-venom. Toxicon, 8:225-33, 1970.
- 68 - VAZ, E. & PEREIRA, A. Doseamento do soro anticrotálico por floculação. An. Inst. Pinheiros, 7(13):3-26, 1944.
- 69 - VENTURINI, L. & VABDENFUT, G.C. Comunicação pessoal.
- 70 - WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 118:197-203, 1981.

ERRATA

- Abstract** - 2º parágrafo, 3ª linha, leia-se:
... Doses of 100, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, and 2,000 Gy were used at a dose rate of 1,190 Gy/h.
- Página 7** - B - PROCEDIMENTO, item b, leia-se:
A solução foi filtrada em papel Whatman nº 1 e distribuída em tubos de ensaio de 12,5 x 1,5 cm com 7,5 ml cada.
- Página 8** - A - REAGENTES, item b, leia-se:
CuSO₄ 5%, em água destilada.
- Página 19** - B - PROCEDIMENTO, leia-se:
Foram efetuadas as seguintes etapas:
- Página 22** - 3º parágrafo, leia-se:
Para verificar o paralelismo das curvas, utilizou-se o teste F^{3,17} entre...
- Página 25** - 4º parágrafo, 2ª linha, leia-se:
... da cadeia polipeptídica...
- Página 28** - Última linha, leia-se:
... os coeficientes angulares e lineares considerados iguais à amostra não irradiada. Já nas amostras irradiadas com 750, 1.000 e 1.500 Gy, embora as ...
- Página 29** - 3º parágrafo, 3ª linha, leia-se:
... em camundongos machos foi de 203 ± 3 µg/kg e 173 ± 17 µg/kg em fêmeas.
5º parágrafo, 5ª linha, leia-se:
... (Laurenti, 1768),...



Serviço de Apoio Didático

USP **Coordenação**
de Atividades Culturais