

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

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CROTOXINA (TOXINA
DO VENENO DE Crotalus durissus terrificus): ESTUDOS
AO NÍVEL MOLECULAR

JAYME NUNES DE SOUZA FILHO

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

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

598.12
S729e

SÃO PAULO
1988

" Se, querendo partir uma pedra, bateste nela cem vezes e nada conseguiste, e se, na centésima primeira vez a pedra se rompeu, não foi esta batida que conseguiu o que querias, mas sim as cem primeiras"

*Dedico este trabalho aos meus pais
Jayme e Odette, ao meu irmão Edson
e em especial ao meu irmão Cláudio
"in memoriam", pessoas que me a-
poiaram e me incentivaram em todo
o decorrer da minha formação.*

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao orientador Dr. José Roberto Rogero, a quem devo parte de minha formação científica, e incentivo constante na elaboração deste.

Este trabalho foi realizado na Divisão de Radiobiologia do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e suportado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, a quem devo o auxílio financeiro.

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CROTOXINA (TOXINA DO VENENO
DE Crotalus durissus terrificus): ESTUDOS AO NÍVEL MOLECULAR**

Jayme Nunes de Souza Filho

RESUMO

Sabe-se que a radiação ionizante possui a capacidade de alterar significativamente, dependendo da dose e condições de irradiação, o comportamento biológico e antigênico de uma toxina, provavelmente por alterações estruturais causadas pela radiação. Neste trabalho, a crotoxina, principal neurotoxina do veneno de cascavel sul-americana, foi isolada utilizando cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-75, seguido de precipitação no ponto isoelétrico. A seguir, frações na concentração de 2 mg de proteína/ml NaCl 0,85% foram irradiadas em uma fonte de radiação gama ^{60}Co sob taxa de dose de 1.00 Gy/h em doses respectivas de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 Gy. Partindo dessas amostras, foram determinados o conteúdo protéico (método de Lowry mod.), o conteúdo de grupamentos SH livres (método de Ellman), o perfil eletroforético (SDS-PAGE), a toxicidade pela dose letal 50% em camundongos e o comportamento antigênico frente ao soro anticrotálico (método de Ouchterlony). Os resultados mostraram a formação de agregados além de ocorrer uma perda de proteína em solução por precipitação. Foi observada a presença de grupamentos sulfidrilas nas amostras irradiadas com doses acima de 1000 Gy, indicando o rompimento de pontes S-S. A dose letal 50% aumentou cerca de 2 vezes para a amostra irradiada com 1000 Gy e, 3,5 vezes para 1500 Gy, mostrando o fenômeno de destoxicação, enquanto que o comportamento antigênico aparentou manter-se intacto até a dose de 1000 Gy.

EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON CROTOXIN (TOXIN OF Crotalus durissus terrificus VENOM): MOLECULAR STUDIES

Jayme Nunes de Souza Filho

ABSTRACT

It is known that the ionizing radiation is able to change significantly the biological and antigenic response of a toxin depending of the dose and irradiation's conditions, probably by structural alterations caused by radiation. In this work, the crotoxin, principal neurotoxin of the South American rattlesnake venom, was isolated using molecular exclusion chromatography with Sephadex G-75 and followed by precipitation on the isoelectric point. Fractions in the concentration of 2 mg of protein/ml 0.85% NaCl were irradiated in a source of ^{60}Co GAMMACELL with dose rate of 100 Gy/h using doses of 250, 500, 1000, 1500 and 2000 Gy. It was determined for these samples, the proteic concentration (Lowry's method), the content sulphhydryl (Ellman's method), the profile electrophoretic (SDS-PAGE), the toxicity by lethal dose 50% in mice and the antigenic response using crotalic antiserum by the diffusion immunoassay (Ouchterlony's method). The results showed the formation of aggregates and loss of protein in solution by precipitation. In the dose of 1000 Gy and higher it was possible to observe the presence of sulphhydryl groups indicating the breakage of S-S bridges. The lethal dose 50% increased 2 times for the dose of 1000 Gy and 3.5 times for 1500 Gy showing a detoxication. By the other hand, the antigenic response seems to be still intact at doses up to 1000 Gy.

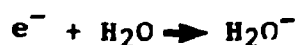
SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Material e Métodos	11
2.1. Obtenção de Toxina	11
2.2. Preparação e Irradiação das Amostras	14
2.3. Determinação de Grupos SH Livres	15
2.4. Determinação do Conteúdo Protéico	16
2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em placa (SDS-PAGE)	17
2.6. Reação de Imunodifusão em ágar-ágar	18
2.7. Determinação da Dose Letal 50%	19
3. Resultados	21
3.1. Obtenção e Purificação da Toxina	21
3.2. Determinação de Grupos SH Livres	26
3.3. Determinação de Conteúdo Protéico	28
3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em placa (SDS-PAGE)	29
3.5. Reação de Imunodifusão em ágar-ágar	30
3.6. Determinação da Dose Letal 50%	35
4. Discussão	39
5. Conclusões	46
6. Referências Bibliográficas	47

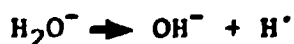
1. INTRODUÇÃO

A radiação ionizante possui a capacidade de, dependendo da dose, taxa de dose e condições do meio, alterar a conformação de uma molécula protéica e por conseqüência provável, modificar seu comportamento biológico, imunogênico e anti-gênico.

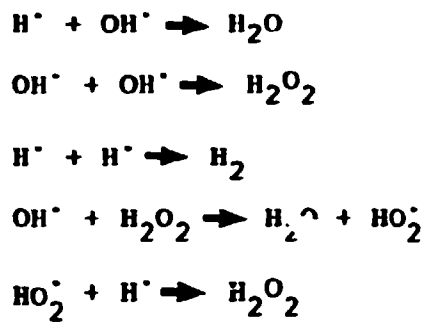
Os efeitos da radiação ionizante em macromoléculas são incrementados quando o fenômeno ocorre em solução aquosa, prevalecendo o efeito indireto da radiação, o qual promove a formação de radicais livres como o OH^\cdot , H^\cdot e e^-_{aq} . e substâncias altamente reativas como a H_2O_2 . Esses produtos são formados por ocasião da deposição da maior parte da energia da radiação nas moléculas de água, pelo processo nomeado de radiólise da água, como segue:



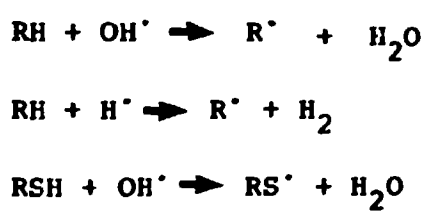
Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis, podendo dissociar-se em:



Os radicais livres H^\cdot e OH^\cdot formados apresentam-se extremamente reativos, como :

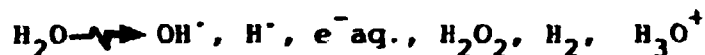


A energia depositada na solução não é distribuída uniformemente na escala microscópica, mas sim em unidades de 20-100 eV e em regiões que se limitam inicialmente em torno de 50 Å de diâmetro e denominadas de "spurs". Por fim, esses produtos primários da radiólise da água, oriundos desses "spurs", reagem com certos grupos da molécula, provocando danos^{6,34}, como se vê no esquema a seguir:



Os produtos RS[·] formados pela equação anterior podem rearranjar-se entre si, resultando em grupos RSSR[·].

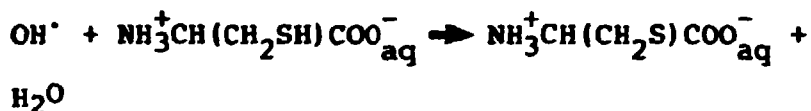
Desta forma, a irradiação da água pura ou soluções diluídas consiste essencialmente em um "ato primário", produzindo espécies moleculares e radicais livres, os quais possuem alto poder de reação com o soluto. Essas espécies são então :



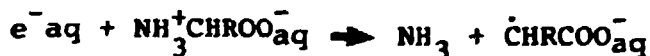
Dentre as espécies citadas, OH^\cdot e o e^-_{aq} tomam relevante importância quando a irradiação é realizada com raios gama ^{60}Co , devido ao fato de possuírem maior rendimento ⁶.

Algumas reações dos principais produtos primários com grupamentos protéicos são exemplificados em seguida:

a) Radical hidroxila (OH^\cdot)



b) Elétron hidratado (e^-_{aq})



c) Radical H^\cdot



A ação da radiação em solução pode ser modificada por vários fatores, como o pH do meio, presença de outras substâncias, concentração, presença de oxigênio, temperatura de irradiação e outros, os quais podem exercer uma radioproteção ou radiosensibilização das macromoléculas que constituem o soluto.

Como agentes radioprotetores muito eficientes ,

podemos citar os aminoácidos, como a cisteína, a qual possui um átomo de hidrogênio lábil, cedendo-o a um certo radical livre macromolecular formado por ação direta ou indireta da radiação^o.

A equação seguinte ilustra o modelo postulado:



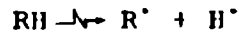
Na ausência de um mecanismo de reparo molecular, o radical livre $\text{~} \cdot$ formado pode ser atacado pelo oxigênio, convertendo-o a um radical peróxido, como vemos:



A esse fenômeno dá-se o nome de "efeito do oxigênio", promovendo a fixação do dano provocado pelos produtos primários, impedindo assim qualquer tipo de reparo molecular.

A radiação pode também contribuir para a formação de ligações covalentes intermoleculares, levando ao aparecimento de dímeros, trímeros e outros em solução, favorecendo até o surgimento de um precipitado. A formação de agregados moleculares pode possivelmente contribuir para a perda da atividade biológica da molécula^o.

Em contraste, o efeito direto da radiação consiste na deposição da energia diretamente na macromolécula, provocando excitações e ionizações que levam à formação de radicais, por exemplo:



A fixação do dano pelo oxigênio pode também ocorrer, resultando em um radical peróxido orgânico RO_2^{\cdot} .

Obviamente, tanto a ação direta como a indireta acarretam danos na proteína, podendo muito provavelmente contribuir para a ocorrência de alterações conformacionais. Essas alterações podem, no entanto, promover modificações significativas em seu comportamento biológico e antigênico.

A preocupação deste trabalho reside no estudo dos efeitos da radiação ionizante ao nível molecular da principal toxina isolada do veneno de Crotalus durissus terrificus (cascavel sul-americana); a crotoxina.

O veneno dessa serpente caracteriza-se por possuir alta toxicidade, causar paralisia flácida e, pelo menos em animais de laboratório, morte por paralisia respiratória, produzir hemólise "in vivo" e "in vitro" e conseqüentemente hemoglobinúria e ser nefrotóxico³⁷. A elevada toxicidade, assim como a atividade hemolítica é devida ao complexo crotoxina, componente protéico isolado em estado cristalino por Slotta e Fraenkel-Conrat em 1938³⁵.

A crotoxina foi considerada uma proteína homogênea com peso molecular em torno de 30.000 daltons por aproximadamente 20 anos. Somente em 1956, os experimentos realizados

por Fraenkel-Conrat e Singer¹³ mostraram, após o tratamento da crotoxina com fluorodinitrobenzeno (FDNB), o surgimento de duas frações, uma solúvel em água e a outra insolúvel, além de apresentarem diferenças nas análises qualitativa e semiquantitativa de aminoácidos e grupamentos terminais.

Em 1971, os trabalhos feitos por Hendon e Fraenkel-Conrat¹⁶ e Rubsamen et alli³³ revelaram a separação e isolamento das frações por cromatografia de troca iônica. As investigações indicaram uma característica ácida para a fração solúvel, além de ser desprovida de atividades hemolítica e neurotóxica devidas ao complexo. Por sua vez, a fração insolúvel apresentou-se com caráter básico e alto poder hemolítico e atividade fosfolipásica, acompanhada de menor toxicidade quando comparada com a crotoxina. A reconstituição do complexo levou a um aumento da toxicidade, além de promover um comportamento neurotóxico. Esse fenômeno sugeriu então, que o componente ácido, denominado de crotapotin por Rubsamen et alli, possui a habilidade de potencializar a toxicidade da fração básica ou por eles chamada de fosfolipase A, e inibir parcialmente a atividade enzimática carregada por esta última^{a*}.

A natureza química do complexo e suas subunidades foram também investigadas por vários autores. Os trabalhos realizados por Hendon e Fraenkel-Conrat¹⁶ sugeriram, por análise de aminoácidos dos componentes isolados, que a fosfolipase A possui 110 resíduos e um peso molecular em torno de 13.000

^{a*} O grupo liderado por Hendon e Fraenkel-Conrat utilizam a nomenclatura: componente A para a fração ácida e componente B para a fração básica do complexo. Já, Rubsamen et alli denominaram crotapotin para a fração ácida e fosfolipase A para

daltons, enquanto que a crotapotin integra 76 resíduos e um peso molecular de 8.400 daltons.

Em 1972, Horst et alii¹⁶ indicaram, por focalização isoelétrica e gel filtração, pontos isoelétricos em pH 3, 7 e 8,6, além de pesos moleculares em torno de 9.000 e 12.000 daltons para a crotapotin e a fosfolipase A, respectivamente.

Em contraposição, no ano de 1974, Breithaupt et alii⁵ em seus experimentos sobre a caracterização química das subunidades isoladas, propuseram 140 resíduos de aminoácidos para a fosfolipase A dispostos em cadeia única, incluindo 16 resíduos de cisteína comprometidos em 8 pontes dissulfeto ligadas intramolecularmente, enquanto que, para a crotapotin, 88 resíduos distribuídos em 3 cadeias suportadas por ligações S-S. Os pontos isoelétricos determinados pelos autores foram em pH 9,7 e 3,4, respectivamente.

Em 1980, Fraenkel-Conrat et alii sequenciaram parcialmente a fosfolipase A, indicando 122 resíduos dispostos em cadeia única, como mostra o estudo comparativo realizado por Aird et alii¹.

Em 1984, Nakazone et alii²⁷ apontaram, por análise de aminoácidos, 113 resíduos e peso molecular mínimo de 13.400 daltons para a fosfolipase A e 74 resíduos e 8.300 daltons para a crotapotin. Os autores verificaram também que a in

teração das subunidades na razão molar de 1:1 provoca o aumento da toxicidade da ordem de 10 vezes, quando comparada com a fosfolipase A isolada.

Em 1986, os trabalhos realizados por Aird et al¹ permitiram mostrar a estrutura primária da fosfolipase A, os quais apresentaram-se com significativa concordância com os achados de Fraenkel-Conrat et al¹, mostrando também o mesmo número de resíduos, contudo, incluindo algumas alterações em várias regiões da molécula.

O sequenciamento parcial da crotapotin foi realizado por Aird et al², mostrando 86 resíduos dispostos em 3 cadeias interligadas por pontes dissulfeto, sendo a cadeia A com 38 resíduos, a B com 34 e a C com 14.

Em 1988, Bon et al¹¹ demonstraram, por cromatografia líquida de alta "performance" (FPLC), a separação e isolamento de 5 isoformas de crototoxina, vindas do veneno de um único exemplar Crotalus durissus terrificus. Essas isoformas apresentaram-se com composição de aminoácidos muito semelhantes, mas distintas o bastante em termos de atividade enzimática e potência letal, a ponto de os autores promoverem uma subdivisão em 2 classes. O trabalho sugere a presença de vários isôgenos que codificam para as isoformas, além de destacar o fenômeno da interação como plausível causa dessas distinções.

Uma série de trabalhos ^{4.17.19.30} além dos já citados, evidenciaram um efeito potencializador produzido pela crotapotin na fosfolipase A, acompanhado de uma diminuição da atividade enzimática, tornando-se então, um complexo molecular associado não covalentemente e de ação neurotóxica. Dessa forma, a inespecificidade da fosfolipase A, a qual possui alta afinidade à membranas, é mascarada pela crotapotin, que segundo Hendon et alli ¹⁷, funciona como um "carregador", participando-a maior especificidade e levando-a ao sítio neuromuscular. Esse fato parece, segundo os autores, ser sucedido pela dissociação do complexo quando este atinge o alvo, vindo a favorecer a ação, agora específica, da fosfolipase A sobre os sítios sinápticos. Essa ação provoca um bloqueio da transmissão neuromuscular na região pre-sináptica, embora existam evidências que o complexo atua também como uma neurotoxina pós-sináptica, provavelmente levando os receptores colinérgicos a um estado conformacional inativo ³.

O mecanismo de atuação do complexo crototoxina postulado por vários autores, parece sugerir uma ação sinérgica entre dois componentes que, quando isolados se tornam, um atóxico e outro de baixa toxicidade e inespecífico. Esse fundamento é incrementado por alguns autores que, utilizando técnicas que visam mostrar aspectos conformacionais de uma proteína, sugerem possíveis alterações estruturais no complexo, quando da associação das subunidades favorecendo muito provavelmente a atividade biológica ^{19.22}.

Em seus trabalhos com troca isotópica hidrogênio-trício, Rogero ³² observou a não concordância entre a curva obtida pela medida da cinética de troca H-T do complexo e aquela oriunda da soma teórica das curvas tidas para as subunidades isoladas, sugerindo alterações conformacionais que poderiam possivelmente favorecer o comportamento biológico do complexo.

A íntima relação estrutura-atividade existente nas proteínas pode, de certo modo, ser afetada com a utilização da radiação ionizante, a qual funciona como uma importante ferramenta no estudo desse binômio. Esse aspecto tem merecido atenções por parte dos pesquisadores, que em inúmeros trabalhos, mostram os efeitos da radiação ao nível molecular, com o comprometimento da atividade biológica ^{8, 9, 21, 24, 25, 26}. Esse fenômeno levou os cientistas ao fundamento de conceitos e idéias extremamente relevantes, despertando o interesse em experimentos como a atenuação de toxinas de animais peçonhentos por radiação, para fins de imunização e produção de soros ^{12, 20, 22, 36}.

Aqui, o interesse reside no estudo dos efeitos da radiação ionizante na crotoxina isolada do veneno de Crotalus durissus territicus. Para tanto, foram verificadas as concentrações das amostras, a presença de grupos SH livres na molécula, o perfil eletroforético e ainda, a atividade biológica e antigênica daquelas irradiadas e nativa. Os resultados mostram importantes alterações, as quais podem nos dar informações relevantes sobre o evento dose-efeito.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da Toxina

2.1.1. Fracionamento do veneno bruto de Crotalus durissus terrificus em cromatografia de exclusão molecular.

Cerca de 300 mg do veneno total foram dissolvidos em 10 ml de ácido acético 0,1 M. O sobrenadante, resultante de um processo de centrifugação a 15000 rpm/15 minutos em uma centrífuga refrigerada SORVALL mod. RC2-B, foi submetido a separação cromatográfica em coluna de 80 cm x 2,5 cm de diâmetro, empacotada com gel Sephadex G-75 "fine" e eluída em ácido acético 0,1 M.

As frações foram recolhidas em um coletor LKB BROMMA 7000 refrigerado a 6°C, sob um fluxo de 13,8 ml/h e coleta de 5,7 ml/tubo. Após, foram determinadas as absorvâncias respectivas em um espectrofotômetro Carl Zeiss mod. PMQ II em comprimento de onda de 280 nm, usando cubetas com percurso óptico de 1 cm.

A figura 1 ilustra o perfil cromatográfico encontrado.

O material encontrado no pico correspondente ao complexo crotoxina foi recolhido e liofilizado em um equipamento VIRTIS mod. 10-102-MD.

2.1.2. Purificação do complexo crotoxina

2.1.2.1. Recromatografia em gel sephadex G-75 " Fine "

Cerca de 55 mg do material isolado no item anterior foram dissolvidos em 2 ml de ácido acético 0,1 M com o auxílio da adição de algumas gotas de ácido acético 1 M no intuito de levar o PH da solução próximo ao do eluente, onde a solubilidade da toxina se torna verídica.

Em seguida, a solução foi sujeita à filtração em papel filtro Whatman nº 1 e o filtrado foi submetido à cromatografia em gel Sephadex G-75 "fine" nas mesmas características relatadas no item anterior.

A figura 2 mostra o perfil resultante.

As frações contidas nos tubos que compuseram o pico foram recolhidas e misturadas em frasco para liofilização. O material foi então liofilizado em equipamento já citado e estocado em dessecador a-18°C.

2.1.2.2. Recromatografia em gel Sephadex G-100 "fine"

Cerca de 10 mg do material isolado no item 2.1.1. foram dissolvidos em 1 ml de tampão formiato 0,1 M pH 3,0 e submetidos a gel filtração em coluna de 80 cm x 1,5 cm de diâmetro, empacotada com gel Sephadex G-100 "fine" e eluída em tampão formiato 0,1 M pH 3,0.

As frações foram recolhidas em um coletor LKB BROMMA 7000 refrigerado a 6°C, sob um fluxo de 13,8 ml/h e recolhimento de 5,7 ml/tubo.

A figura 3 mostra o perfil cromatográfico encontrado, baseando-se nas leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 280 nm, usando cubetas com percurso óptico de 1 cm.

2.1.3. Precipitação da Crotoxina no Ponto Isoelétrico pI 4,7

Cerca de 30 mg de crotoxina recromatografada foram dissolvidos em 4 ml de água destilada. Em seguida, foram adicionadas algumas gotas de ácido fórmico 1 M até a solução atingir pH 3,0, titulando-a logo após com hidróxido de amônio 0,1 M até encontrar o pI. Tão logo isso ocorreu, a solução foi submetida a centrifugação a 15.000 rpm/20 minutos em uma centri

fuga refrigerada SORVALL mod. RC2-B. Após a separação do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em tampão formiato 0,1 M pH 3,0.

As amostras foram então liofilizadas e estocadas em dessecador a -18°C.

A figura 4 revela a utilização da reação de imunodifusão em ágar descrita no item 2.6, adotada como critério de pureza na avaliação da fração obtida.

2.2. Preparação e Irradiação das Amostras

Após a precipitação em seu ponto isoelétrico e o consequente isolamento, 20 mg de crotoxina foram dissolvidos em 10 ml NaCl 0,85%. Em seguida, foram adicionadas algumas gotas de ácido clorídrico 0,1 M até que a solução atingisse pH 3,6, onde a solubilidade da toxina parece ocorrer.

Isto feito, a solução foi sujeita à filtração em papel filtro Whatman nº1. O filtrado foi separado em 6 tubos de ensaio e finalmente submetidos à irradiação em uma fonte gama ^{60}Co , sob taxa de dose de 1100 Gy/h em doses de radiação de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 Gy, mantendo uma alíquota como amostra nativa.

2.3. Determinação de Grupos SH Livres

Com a intenção de observar possível presença de grupos SH livres na molécula protéica, utilizamo-nos do método descrito por Ellman ¹⁰, onde se usa a cisteína na obtenção dos valores padrão e o reagente ácido 5,5' ditiobis - 2-nitrobenzôico (DTNB), além de modificações introduzidas por Simizu conforme Rogero ³², que seguem abaixo: em 0,250 ml da solução de proteína, foram adicionados 0,880 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 0,030 ml de solução de EDTA 0,1 M em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 1,840 ml de água destilada e finalmente 0,020 ml de reativo de Ellman (20 mg de ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzôico em 5 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0).

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Carl Zeiss PMQ II em comprimento de onda de 412 nm, após 10 minutos de reação em temperatura ambiente, contra um branco contendo tampão, solução de EDTA, água destilada e reagente de Ellman nas mesmas concentrações e volumes, além de 0,250 ml NaCl 0,85% .

A curva padrão de dosagem realizada com solução de cisteína em concentrações que variaram entre 10^{-3} e 10^{-4} M, foi tratada matematicamente por regressão linear (PROC REG) com auxílio do " Statistical Analysis Systems " (SAS) pelo Centro de Processamento de Dados do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

As tabelas I e II mostram respectivamente, os valores de absorvâncias do padrão de dosagem e das amostras, utilizados no tratamento matemático dos dados.

A tabela III fornece a concentração final de Cys não comprometidas em pontes S-S, expressa em molaridade, para cada amostra, baseando-se na estimativa do método.

2.4. Determinação do Conteúdo Protéico

O conteúdo protéico das amostras irradiadas e posteriormente filtradas em papel filtro Whatman nº 1, além daquela nativa de crotoxina foram determinadas segundo o método descrito por Lowry²³ e modificado por Miller²⁶, o qual utiliza o soro albumina bovino como padrão de dosagem.

Os valores de concentração protéica encontrados para o padrão foram tratados matematicamente pelo mesmo sistema citado no item 2.3, no intuito de enquadrar os achados para as amostras.

As tabelas IV e V mostram respectivamente, valores de absorvâncias do padrão e das amostras, usados no tratamento matemático.

A tabela VI indica a concentração final de proteína em $\mu\text{g/ml}$ NaCl 0,85%, bem como a concentração relativa

para cada amostra, baseando-se na estimativa do método.

2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Placa (SDS-PAGE)

As amostras irradiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo de C.d. terrificus foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em placa (SDS-PAGE), segundo o método descrito por James¹⁴, em sistema descontínuo.

As concentrações finais dos tampões usados foram: tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 para o gel de empilhamento; tampão Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 para gel de resolução e Tris 0,025 M glicina 0,192 M pH 8,3 para o tampão de corrida.

A preparação das amostras incluiu uma solução com SDS 2% e β -mercaptoetanol 2% em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, a qual, em 0,1 ml foram adicionados 0,1 g de uréia e 0,1 ml da solução de proteína (0,150 mg/ml NaCl 0,85%, aferido pelo método de Lowry modificado). Desta, foram retirados 0,050 ml e adicionados em 0,010 ml de azul de bromofenol 0,002%. Finalmente, 0,050 ml desta foram aplicados na placa.

Após a corrida (160 V / 3h), a placa foi tratada com ácido tricloroacético 12%, por 24 horas, corada com Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% (0,12 g de corante; 20 ml ácido

acético glacial; 50 ml metanol; 50 ml água destilada) e descorada com ácido acético 7%.

A fotografia da placa de eletroforese dispõe-se na figura 5.

2.6. Reação de Imunodifusão em ágar-ágar

As amostras irradiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo de C. d. terrificus foram submetidas à reação de imunodifusão em ágar-ágar frente ao soro anticrotálico, gentilmente cedido pelo Instituto Butantan (São Paulo-Brasil), segundo o método descrito por Ouchterlony²⁹.

O tempo de difusão das amostras no ágar a 2% (1 g de ágar-ágar em 50 ml tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) foi de 24 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas, coradas com negro de amido 0,4% (1 g de negro de amido; 25 ml de ácido acético glacial; água destilada qsq 250 ml) e descorada com ácido acético 5% .

As figuras 6, 7, 8 e 9 mostram as linhas de precipitação das amostras irradiadas frente ao soro anticrotálico, além daquela dada pela toxina nativa.

2.7. Determinação da Dose Letal 50% (DL50)

A determinação da toxicidade da amostra nativa de crotoxina e aquelas irradiadas foi feita pelo cálculo da respectiva dose letal 50%, descrito no método de Reed e Muench³¹.

A medida da DL50 foi realizada em camundongos albinos fêmeas com peso aproximado de 24 g cada, sob dieta normal. Foram separados para cada amostra, 6 grupos com 6 animais cada um, além de um grupo controle.

As diluições das amostras foram realizadas segundo os resultados estimados pelo método de Lowry modificado, em intervalos de concentração apropriados que variaram com as amostras. O fator de diluição aplicado foi de 1:1,33 para as amostras irradiadas e nativa, exceto para aquela irradiada com 1500 Gy, onde o fator usado foi de 1:1,5.

As mortes e sobrevividas foram anotadas 24 horas após a inoculação que ocorreu em período vespertino.

As tabelas VII, VIII, IX, X e XI indicam as porcentagens de mortalidade nas várias diluições, para as amostras.

O cálculo foi realizado do seguinte modo:

$$C = \log Z + (\text{d.p.} \times \log A) \quad \text{onde :}$$

Z é a diluição inferior ao valor que provocou 50% de morte;

A é o fator de diluição aplicado;

d.p. é a distância proporcional, fornecida por:

$$\text{d.p.} = \frac{50 - Y}{X - Y} \quad \text{onde:}$$

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 ;

Finalmente, o antilog de C nos forneceu a diluição exata em que ocorreu 50% de morte, e, conseqüentemente a concentração em µg/Kg de peso.

A tabela XII resume as DL50 encontradas para as várias amostras.

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção e Purificação da Toxina

3.1.1. Fracionamento e Isolamento por gel filtração em Sephadex.

A toxina utilizada neste trabalho foi obtida e purificada a partir do veneno bruto e seco de Crotalus durissus terrificus (cascavel sul-americana), procedente do Estado de Goiás (GO).

A separação das frações protéicas foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G - 75 " fine ", como mostra o perfil da figura 1 .

O pico III que corresponde à crotoxina foi isolado e submetido a recromatografia nos mesmos moldes, a fim de tentarmos extrair alguma possível fração vinda por contaminação cruzada.

A figura 2 ilustra o perfil resultante.

Uma fração da crotoxina obtida na recromatografia foi submetida à cromatografia em gel Sephadex G-100 " fine " em tampão formiato 0,1 M pH 3,0 no sentido de podermos perceber o comportamento da toxina nesse sistema.

A figura 3 mostra o perfil encontrado.

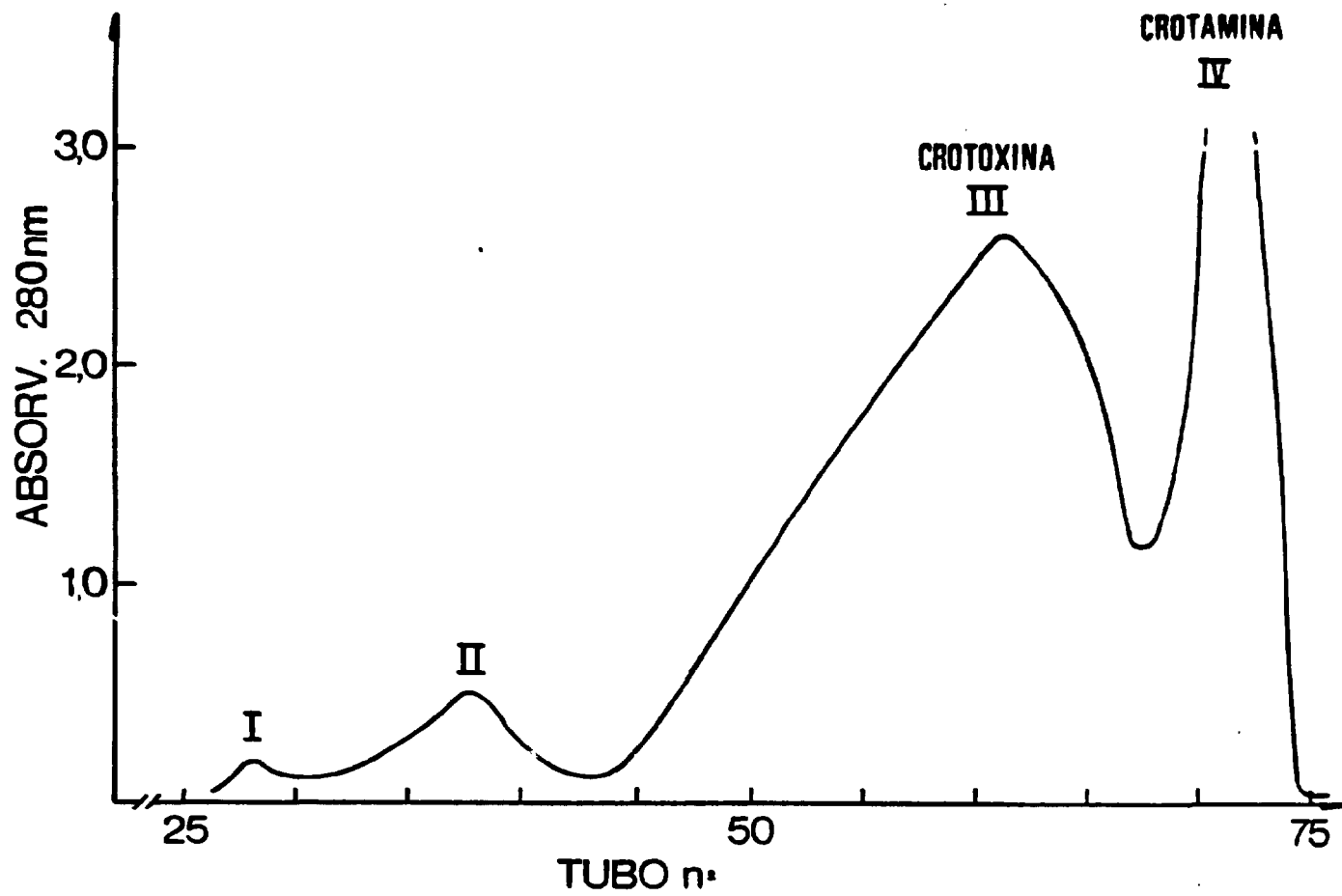


FIGURA 1 : Fracionamento em gel filtração do veneno total de C.d. terrificus em Sephadex G-75 "fine" em coluna de 80 cm x 2,5 cm de diâmetro e eluída em ácido acético 0,1 M. Perfil cromatográfico de 300 mg de veneno/10 ml ác. acético 0,1 M, sob fluxo de 13,8 ml/h com recolhimento de 5,7 ml/tubo.

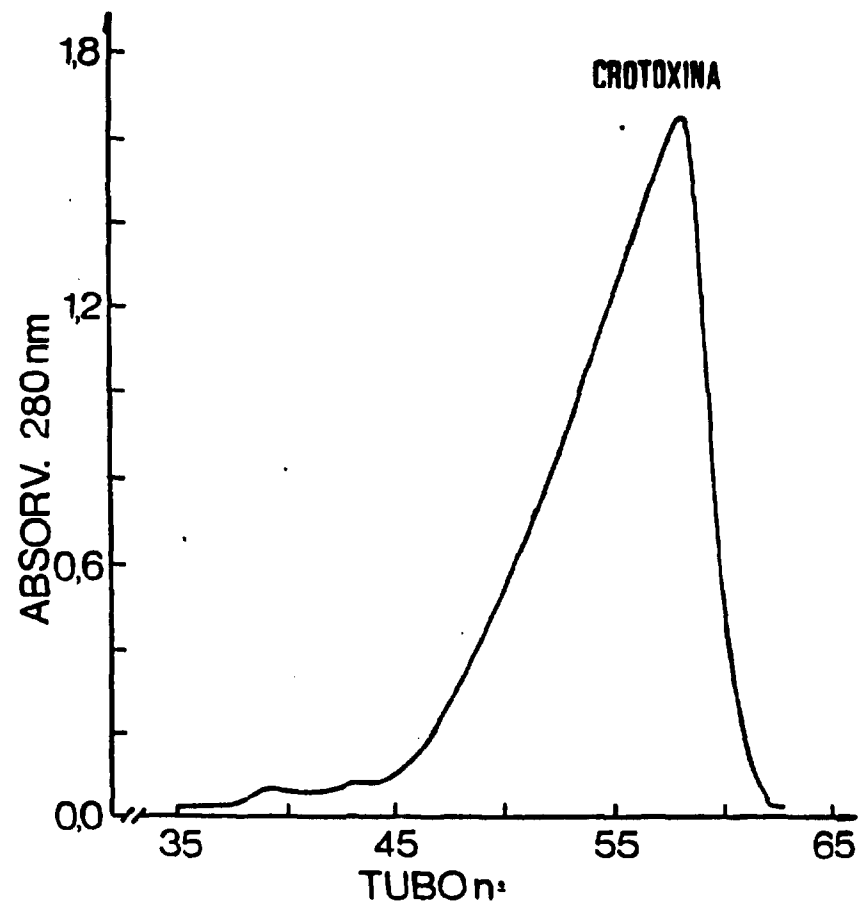


FIGURA 2 : Recromatografia da crotoxina em gel Sephadex G-75 "fine". Perfil de 55 mg de proteína/2 ml ác. acético 0,1 M, sob fluxo de 13,8 ml/h com recolhimento de 5,7 ml/tubo.

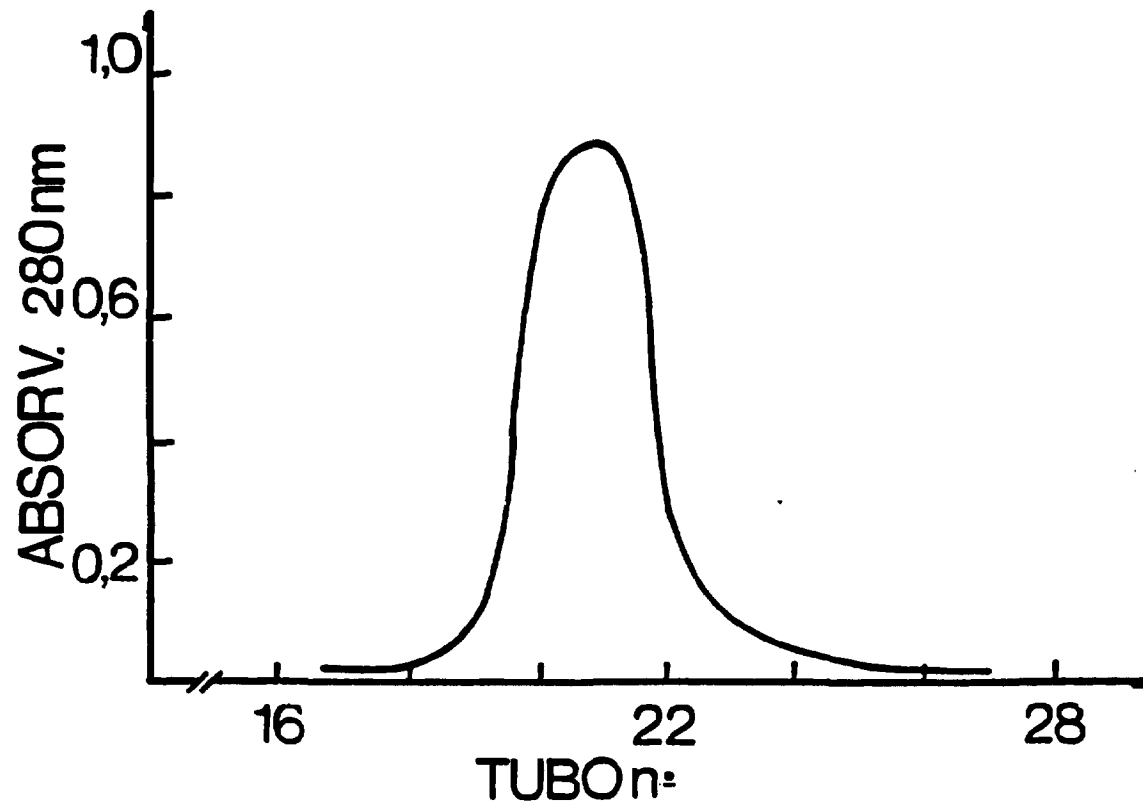


FIGURA 3 : Recromatografia da crotoxina em gel Sephadex G-100 "fine" em coluna de 80 cm x 1,5 cm de diâmetro e eluída em tampão formiato 0,1 M pH 3,0. Perfil cromatográfico de 10 mg de proteína/1 ml do mesmo tampão, sob fluxo de 13,8 ml/h com recolhimento de 5,7 ml/tubo.

3.1.2. Purificação por precipitação no ponto i soelétrico.

A crotoxina isolada cromatograficamente foi sub-
metida à reação de imunodifusão em ágar-ágar, utilizada como
critério para a avaliação de pureza, o qual sugeriu a presença
de um contaminante, mesmo após recromatografia. Por isso, o lo-
te isolado foi sujeito a um processo de purificação por preci-
pitação no ponto isoelétrico da crotoxina (pI 4,7) e as fra-
ções resultantes foram novamente submetidas ao mesmo critério.

Os resultados da reação de imunodifusão frente
ao soro anticrotálico encontram-se na figura 4.

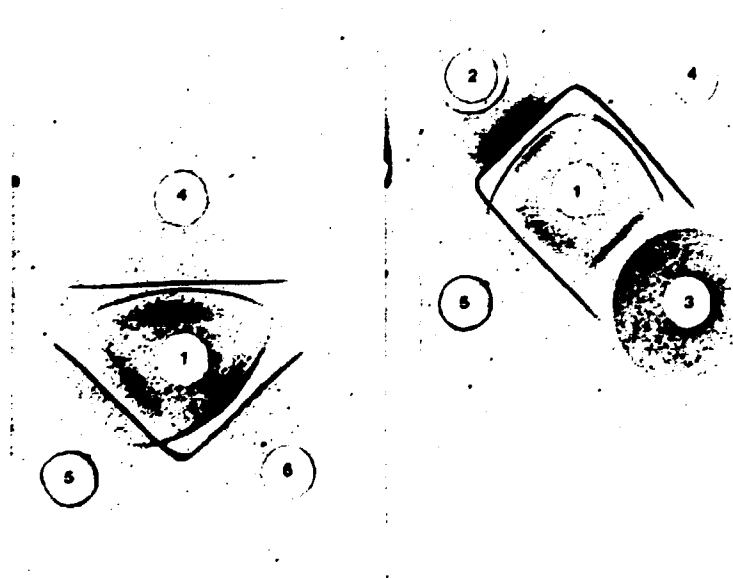


FIGURA 4 : Reação de imunodifusão em ágar-ágar a 2%
em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Cerca de
10 μ l foram utilizados no preenchimento
do poço.

- 1: soro anticrotálico;
- 2: veneno total nativo de C.d.terrificus;
- 3: crotamina nativa;
- 4: crotoxina obtida por recromatografia;
- 5: crotoxina obtida por recromatografia e precipitação no pI;
- 6: associação do precipitado e sobrenadante.

3.2. Determinação de Grupos SH Livres

O método de Ellman ¹⁰ foi empregado a fim de tentarmos perceber possíveis grupamentos SH livres na molécula.

TABELA I : Dados obtidos como padrão de dosagem para determinação de grupamentos SH livres (método de Ellman)

CONCENTRAÇÃO DE CISTEÍNA ($\times 10^{-4}$ M)	ABSORVÂNCIA A		
		412 nm	
10,00	1,150	1,150	1,160
5,00	0,505	0,490	0,500
2,50	0,210	0,212	0,214
1,66	0,130	0,140	0,140
1,25	0,100	0,100	0,110
1,00	0,090	0,090	0,090
0,83	0,050	0,058	0,057

TABELA II : Valores de absorvâncias encontrados para as amostras submetidas ao método de Ellman.

AMOSTRA DE CROTOXINA	ABSORVÂNCIA A 412 nm	
Nativa	--	--
250 GY	0,030	0,020
500 GY	0,065	0,050
1000 GY	0,185	0,205
1500 GY	0,200	0,220
2000 GY	0,590	0,590

TABELA III : Concentração final de Cys não comprometidas em pontes S-S (estimada pelo método de Ellman).

AMOSTRA DE CROTOXINA	CONCENTRAÇÃO DE Cys ($\times 10^{-4}$ M)
Nativa	0
250 GY	0,23 \pm 0,06
500 GY	0,52 \pm 0,09
1000 GY	1,78 \pm 0,13
1500 GY	1,91 \pm 0,13
2000 GY	5,39

3.3. Determinação de Conteúdo Protéico

O método de Lowry ²³ modificado por Miller ²⁶ foi realizado com o intuito de determinarmos o conteúdo proteico de cada amostra.

TABELA IV: Dados obtidos como padrão de dosagem para determinação de conteúdo proteico (método de Lowry modificado).

CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)	ABSORVÂNCIA A 650 nm				
200	0,790	0,820	0,800	0,810	0,810
100	0,425	0,435	0,440	0,430	0,420
50	0,220	0,230	0,220	0,220	0,225
25	0,112	0,117	0,118	0,120	0,130
12,5	0,060	0,066	0,070	0,067	---

TABELA V : Valores de absorvâncias encontrados para as amostras submetidas ao método de Lowry modificado.

AMOSTRA DE CROTOXINA	ABSORVÂNCIA A 650 nm				
Nativa	0,260	0,270	0,275	0,260	0,265
250 GY	0,270	0,285	0,290	0,275	0,290
500 GY	0,295	0,295	0,285	0,285	0,290
1000 GY	0,225	0,245	0,230	0,230	0,220
1500 GY	0,150	0,175	0,180	0,170	0,155
2000 GY	0,108	0,118	0,108	0,103	0,105

TABELA VI : Concentração final de proteína em solução (estimada pelo método de Lowry modificado)

AMOSTRA DE CROTOXINA	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/ml NaCl 0,85%)	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)
Nativa	2589 ± 63	100
250 GY	2745 ± 88	106 ± 6
500 GY	2822 ± 49	109 ± 4
1000 GY	2238 ± 91	86,5 ± 5,5
1500 GY	1616 ± 126	62,5 ± 6,5
2000 GY	1055 ± 56	41 ± 3

3.4. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE), seguindo o método descrito por Hammes¹⁴, em sistema descontínuo.

A placa foi corada com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,1%.

A figura 5 revela apenas o gel de resolução.

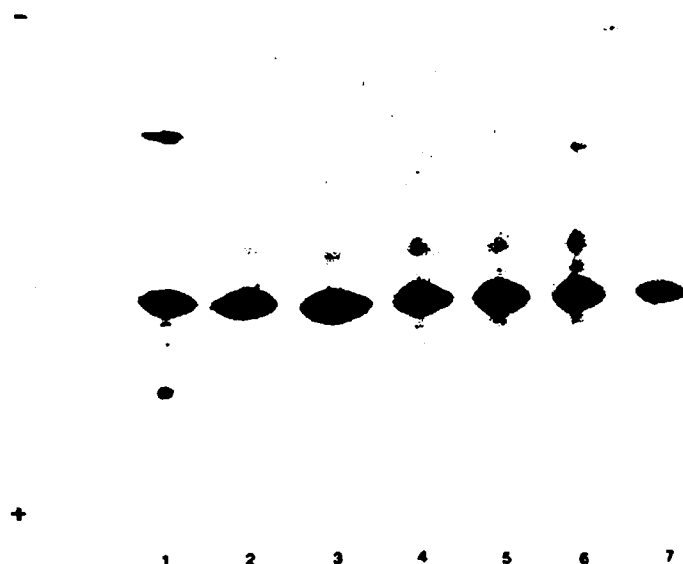


FIGURA 5 : Eletroforese em gel de poliacrilamida .

1 : veneno total nativo de Crotalus duris
sus terrificus;

2 : crotoxina nativa;

3 a 7 : crotoxina irradiada com doses de
250, 500, 1000, 1500 e 2000 GY, res
pectivamente.

3.5. Reação de imunodifusão em ágar-ágar.

As várias amostras da toxina foram submetidas à reação de imunodifusão em ágar-ágar a 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, descrita por Ouchterlony²⁹, na intenção de tentarmos notar o comportamento dos antígenos irradiados frente ao soro anticrotálico.

Cerca de 10 μ l foram usados no preenchimento do poço.

As figuras 6, 7, 8 e 9 mostram a reação, após coloração com negro de amido 0,4%.

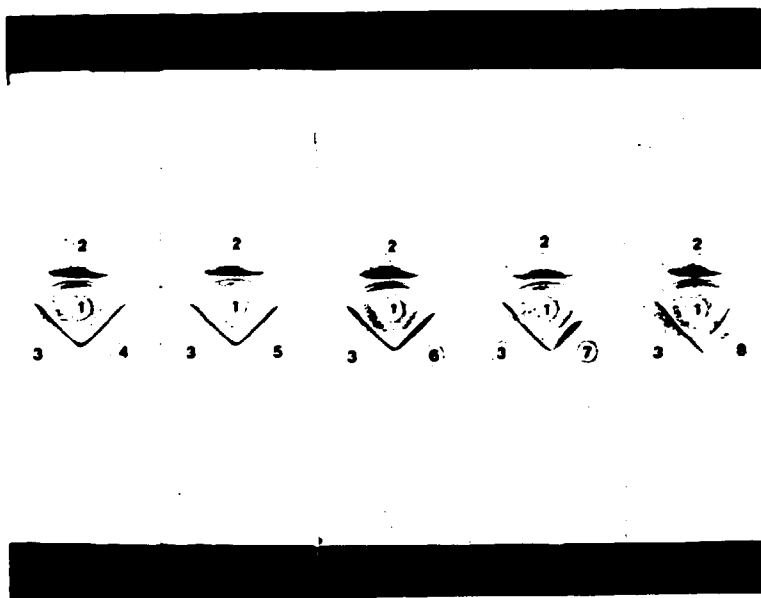


FIGURA 6 : Reação de imunodifusão em ágar-ágar.

- 1: soro anticrotálico;
- 2: veneno total nativo de C.d.terrificus;
- 3: crotoxina nativa;
- 4 a 8 : crotoxina irradiada com doses de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 GY , respectivamente.

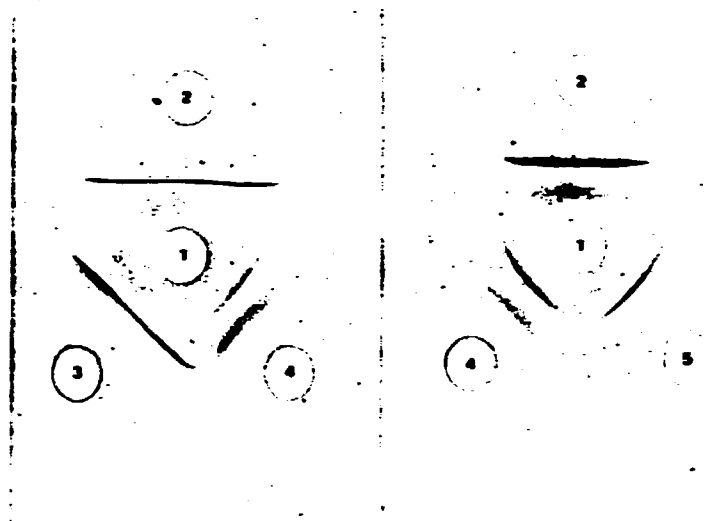


FIGURA 7 : Reação de imunodifusão em ágar-ágar.

1: soro anticrotálico;

2: crotoxina nativa;

3 a 5 : crotoxina irradiada com doses de 1000, 1500 e 2000 GY, respectivamente.

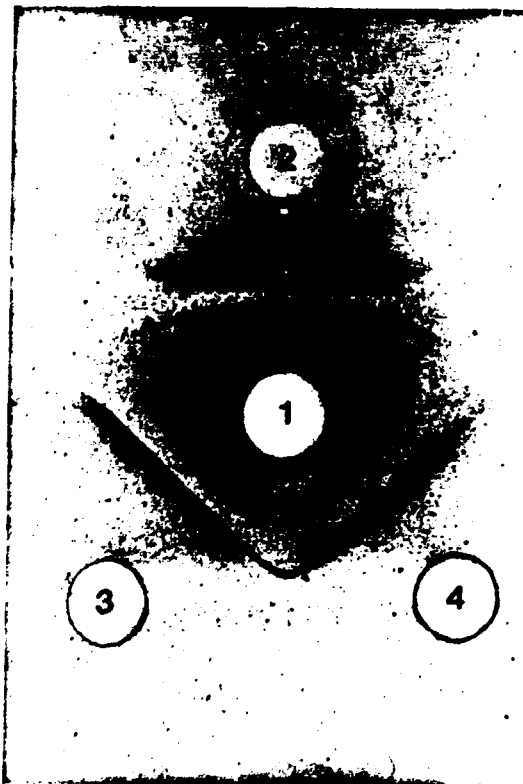


FIGURA 8 : Reação de imunodifusão em ágar-ágar.

1: soro anticrotálico;

2: veneno total nativo de C.d.terrificus;

3: crotoxina nativa ;

4: crotoxina irradiada com 1000 Gy.

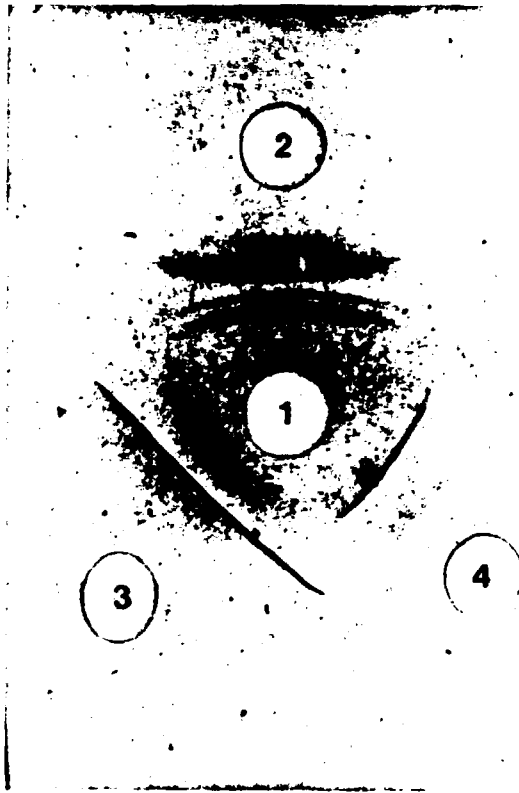


FIGURA 9 : Reação de imunodifusão em ágar-ágar.

- 1: soro anticrotálico;
- 2: veneno total nativo de C.d.terrificus;
- 3: crotoxina nativa;
- 4: crotoxina irradiada com 2000 Gy.

3.6. Determinação da Dose Letal 50% (DL50)

A toxicidade de cada amostra foi determinada em camundongos albinos fêmeas pelo cálculo da dose letal 50%, segundo o método descrito por Reed e Muench³¹.

As tabelas VII, VIII, IX, X e XI mostram as várias concentrações aplicadas para cada amostra, bem como as respectivas taxas de mortalidade encontradas após um período de observação de 24 horas.

TABELA VII : Toxicidade da crotoxina nativa

CONCENTRAÇÃO DA TOXINA(μ g/Kg)	% DE MORTALIDADE
300	100
225,56	100
169,60	60
127,52	40
95,88	0
72,09	0

TABELA VIII : Toxicidade da crotoxina irradiada com dose de 250 Gy.

CONCENTRAÇÃO DA TOXINA (μ g/Kg)	% DE MORTALIDADE
300	92,3
225,56	70
169,60	33,3
127,52	0
95,88	0
72,09	0

TABELA IX : Toxicidade da crotoxina irradiada com 500 Gy.

CONCENTRAÇÃO DA TOXINA (μ g/Kg)	% DE MORTALIDADE
500	100
375,94	100
282,66	83,3
212,53	54,54
159,80	25
120,15	6,66

TABELA X : Toxicidade da crotoxina irradiada com 1000 Gy.

CONCENTRAÇÃO DA TOXINA($\mu\text{g/Kg}$)	% DE MORTALIDADE
800	100
601,50	94,4
452,26	85,71
340,44	58,33
255,67	33,33
192,23	7,14

TABELA XI : Toxicidade da crotoxina irradiada com 1500 Gy.

CONCENTRAÇÃO DA TOXINA($\mu\text{g/Kg}$)	% DE MORTALIDADE
1000	100
666,67	100
444,45	16,66
296,30	0
197,53	0
131,69	0

A tabela XII resume as DL50 encontradas pelo cálculo descrito por Reed e Muench.

TABELA XII: Apresentação das DL 50 calculadas para as várias amostras (método de Reed e Muench).

AMOSTRA DE CROTOXINA	DL 50 (μ g/Kg de peso)
Nativa	147 \pm 4
250 GY	193 \pm 6
500 GY	203 \pm 4
1000 GY	309 \pm 13
1500 GY	523 \pm 41

4. DISCUSSÃO

Os efeitos indiretos da radiação ionizante em macromoléculas apresentam-se mais danosos quando comparados com os efeitos diretos, justamente pela ação dos chamados produtos primários da radiólise da água que, por serem altamente reativos, podem acarretar alterações moleculares. Esses efeitos podem ser controlados pela adição de substâncias conhecidas como "scavengers" no meio a ser irradiado, as quais atuam com um caráter radioprotetor, reagindo com radicais livres específicos, "neutralizando-os". Como exemplo podemos citar o agente t-butanol que coloca a ação do elétron hidratado em evidência pelo fato de reagir com o radical hidroxila, não permitindo sua manifestação⁶. Esse tipo de procedimento é utilizado, dentre outras aplicações, no estudo dos mecanismos de ação, sítios de ataque e efeitos provocados por um determinado produto primário ou algum produto oriundo deste, na macromolécula⁶.

Os efeitos da radiação ionizante como forma de a tenuação de toxinas proteicas tem merecido atenções há alguns a nos, justamente pelo fato de o índice de acidentes com animais peçonhentos ter aumentado significativamente nos países tropi cais, elevando a produção de soros e, em consequência, a imu nização em animais^{12, 20, 22, 30}.

A atenuação de toxinas protéicas por meio de radiação constitui, segundo vários autores, um processo no qual não é necessária a adição de um dado agente químico como forma de destoxicação, o qual poderia interferir na imunização do animal ou até mesmo apresentar um grau de toxicidade ao animal, o que não tornaria o processo exequível.

Neste trabalho, a principal toxina do veneno de Crotalus durissus terrificus foi isolada por cromatografia de exclusão molecular seguida de um processo de purificação por precipitação no ponto isoelétrico e seus comportamentos foram estudados após a radiação gama de ^{60}Co em solução aquosa.

A cromatografia por exclusão em gel Sephadex G-75 "fine" do veneno total de Crotalus durissus terrificus nos permite separar a crotoxina das outras frações protéicas, mas o grau de pureza parece apresentar-se significativamente comprometido, quando o material isolado é avaliado sob a reação de imunodifusão em ágar frente ao soro anticrotálico, mesmo após a recromatografia nos mesmos moldes. Desse modo, a purificação da crotoxina isolada por cromatografia foi realizada com a precipitação em seu ponto isoelétrico (pI 4,7), por titulação.

As frações resultantes dos processos de separação, bem como a crotamina (outra toxina presente no veneno, de caráter básico e PM ~ 4880 daltons) foram submetidas a crité-

rios de pureza, como a reação de imunodifusão em ágar e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os resultados revelados mostram que o material isolado por cromatografia apresenta um segundo componente com propriedades imunogênicas e antigênicas bastante proeminentes, o que indica que a gel filtração, conforme características citadas, inclui um contaminante protéico com volume efluente próximo ao do complexo crotoxina. Esse componente parece ter sido extraído após a precipitação da proteína em pH 4,7.

Em seguida, a crotoxina foi submetida à radiação gama ^{60}Co em várias doses, em solução aquosa de pH 3,6.

Imediatamente após a irradiação, foi realizada a determinação de grupos SH livres na proteína, segundo o método descrito por Ellman¹⁰. Os resultados indicam a ausência desses grupos na molécula nativa, concordando com os achados de Breithaupt et alli⁵ e Rogero^{3,2} de que os resíduos de cisteína poderiam estar comprometidos em pontes dissulfeto, sem exceção.

Os trabalhos realizados por Aird et alli^{1,2} na determinação das estruturas primárias das subunidades isoladas assumem 14 pontes dissulfeto, sendo 7 em cada componente. Com isso, considerando que o complexo possua 28 Cys e se todas as pontes S-S fossem rompidas, então teríamos $3,02 \times 10^{-3}$ moles de Cys, assumindo a concentração da amostra nativa estimada pelo método de Lowry²³ modificado e o peso molecular de 24.000

daltons para o complexo, tornando suficiente o bastante para ser detectado pelo método.

Em vista disso, os resultados indicam o aparecimento de 1,65 moles de Cys/mole e 1,77 moles de Cys/mole, o que sugerem a provável quebra de 1 ponte S-S/molécula nas amostras irradiadas com doses respectivas de 1000 e 1500 Gy, enquanto que a dose de 2000 Gy, pela estimativa do método que indicou 5 moles de Cys/mole de proteína, parece ter sido suficientemente capaz de romper 3 pontes S-S. As amostras irradiadas com doses de 250 e 500 Gy parecem não ter sido afetadas quanto a esse aspecto, o que não quer dizer que a integridade estrutural foi mantida.

A determinação do conteúdo protéico foi realizada pelo método de Lowry²³ modificado por Miller²⁴, utilizando o soro albumina bovino como padrão de dosagem.

A comparação das amostras irradiadas em frente da nativa permite enfatizar que aquela irradiada com dose de 1000 Gy apresenta aproximadamente 85% de proteína em solução, com cerca de apenas 15% de perda por agregação e precipitação, ao passo que aquela irradiada com 1500 Gy promove 65% de material protéico solúvel e aquela com 2000 Gy, apenas 40% aproximadamente. As amostras irradiadas com doses de 250 e 500 Gy não apresentaram resultados significativamente diferentes, quando comparados os da nativa.

Em frente desses dados, fica claro a ocorrência de uma perda protéica em solução, por agregação e precipitação, a partir de certa dose e torna-se significativa à medida que aumenta a dose de radiação.

A amostra nativa indicou uma concentração de 2589 ± 63 ug/ml NaCl 0,85% promovendo uma relativa superestimativa da ordem 25%, quando levada a comparação com a concentração idealizada. Esse fato pode talvez ser explicado pelos achados de Darke et alii onde enfatizam que a dosagem de fosfolipase A2 vinda do veneno de Naja naja naja, quando estimada pelo método de Lowry²³ modificado e pelo uso de soro albumina bovino como pa-drão, parece provocar um valor de concentração maior que o re-al. Contudo, a utilização do método foi suportada pelo fato de ser amplamente reconhecido e largamente usado por inúmeros auto-res, além de possuir um grau de sensibilidade considerado.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % (SDS-PAGE) em sistema descontínuo, realizada com as amostras ir-radiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo de C. d.terrificus mostrou a presença de zonas difusas que aumentam de intensidade com o acréscimo da dose de radiação e ainda, " zo-nas de preferências " podem ser notadas, apresentando pesos mo-leculares mais elevados quando comparados com o do complexo cro-toxina, por possuírem menor mobilidade. Esse fato pode indicar a formação de rearranjos protéicos por ligações intermolecula-res provocadas de alguma forma pela radiação.

A reação de imunodifusão em ágar-ágar descrita por Ouchterlony²⁹, observada nas figuras 6, 7, 8 e 9, revela o comportamento antigênico das amostras de crotoxina e veneno total nativo de C. d. terrificus e aquelas irradiadas, por observação das linhas de precipitação que representam a identidade antígeno-anticorpo.

O comportamento antigênico das amostras irradiadas até a dose de 1000 Gy aparenta não ter sido afetado pela radiação, indicando linhas de identidade condizentes com a nativa. Por outro lado, aquelas irradiadas com doses de 1500 e 2000 Gy apresentaram-se bastante alteradas, indicando até o aparecimento de uma segunda linha de precipitação em posição que nos permite enfatizar uma maior mobilidade de migração do antígeno.

A dose de 2000 Gy parece, segundo o método aplicado, ter sido suficientemente capaz de destruir a capacidade antigênica do complexo crotoxina, contudo, o surgimento de uma linha de precipitação tornou-se proeminente.

A determinação da dose letal 50% (DL50) em camundongos nos faz ver uma gradativa destoxicação parcial da toxina com o aumento da dose de radiação. É fato importante notar que a amostra de crotoxina irradiada com dose de 1000 Gy apresentou uma diminuição da toxicidade da ordem de 2 vezes e aquela irradiada com 1500 Gy, em torno de 3,5 vezes, sugerindo

o comprometimento da "região neurotóxica".

As doses de 250 e 500 Gy parecem não ter sido suficientes o bastante para promover alterações moleculares capazes de modificar significativamente os comportamentos da toxina, a pesar de as amostras irradiadas com tais doses apresentaram-se atenuadas em cerca de 1,3 e 1,4 vezes respectivamente, quando comparadas com a amostra de crotoxina nativa (DL50 ip 147 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

O rompimento de pontes dissulfeto nas amostras irradiadas a partir de 1000 Gy poderia sugerir uma contribuição no comprometimento da integridade estrutural da toxina e, por consequência, a atenuação da toxicidade.

Um perfil comparativo entre o comportamento biológico e o antigênico deve ser traçado, mostrando que a antigenicidade da crotoxina aparentou manter-se intacta até a dose de 1000 Gy, enquanto que sua toxicidade diminuiu cerca de 2 vezes, o que poderia sugerir que as regiões da molécula onde estão dispostos os determinantes antigênicos diferem daquela onde reside o sítio neurotóxico.

Esses resultados inbuem uma importância extrema no estudo da relação estrutura-atividade do complexo crotoxina, além de revelar informações que podem contribuir para os estudos de atenuação do veneno crotálico por radiação.

3. CONCLUSÕES

1. O fracionamento do veneno bruto de Crotalus durissus terrifi
cus, segundo a metodologia utilizada, inclui uma fração con-
taminante no pico correspondente ao complexo crotoxina, apre-
sentando-se bastante antigênica em frente do soro anticrotáli-
co.
2. O grau de pureza da crotoxina apresentou-se satisfatório a
pós sua precipitação no ponto isoelétrico, por titulação.
3. As amostras irradiadas com doses a partir de 1000 Gy apresen-
taram grupamentos sulfidrilas livres, indicando o rompimento
de pontes S-S do complexo.
4. A formação de agregados protéicos ocorreu desde a dose de
250 Gy, com conseqüente perda de proteína em solução, por
precipitação, a partir de 1000 Gy.
5. O comportamento antigênico das amostras irradiadas até a do-
se de 1000 Gy, segundo a metodologia aplicada, apresentou li-
nhas de precipitação semelhantes às da nativa.
6. A dose letal 50% aumentou cerca de 2 vezes para a amostra ir-
radiada com 1000 Gy e, por volta de 3,5 vezes para aquela ir-
radiada com dose de 1500 Gy.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. A complete amido acid sequence for the basic subunit of crotoxin. Arch. Biochem. Biophys., 249 (2):296 - 300, 1986.
02. AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: Primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. Biochemistry, 24:7054-8, 1985.
03. BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. Eur. J. Biochem., 99: 471 - 81, 1979.
04. BREITHAUPT, H.; OMORI-SATOH, T.; LANG, J. Isolation and characterization of the three phospholipases A from the crotoxin complex. Biochim. Biophys. Acta, 403: 355 - 69, 1975.
05. BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. Eur. J Biochem., 49: 333 - 45, 1974.

06. BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanism of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24: 273 - 82, 1984.
07. DARKE, P.L.; JARVIN, A.A.; DEEMS, R.A.; DENNIS, E.A. Further characterization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta, 626: 154 - 61, 1980.
08. DERTINGER, H. & JUNG, H. The action of radiation on enzymes: the example of ribonuclease. In: DERTINGER, H. & JUNG, H. Molecular Radiation Biology. Berlin, Springer-Verlag, 1970; p. 115 - 33.
09. DUDA, W. Effect of γ -irradiation on the α and β chains of bovine hemoglobin and globin. Radiat. Res., 86: 123 - 32, 1981.
10. ELLMAN, G.L. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82: 70 - 7, 1959.
11. 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 - 38, 1980.

12. FLOWERS, H.H. Problems encountered in the production of a potent entivenin. In: International Atomic Energy Agency. Radiation Sensitivity of Toxins and Animal Poisons: Proceedings of a Panel on..., held in Bangkok, May 19 - 22, 1969. Vienna, 1970.
13. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. Arch. Biochem. Biophys., 60: 64 - 73, 1956.
14. HAMES, B.D. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D. & RICK-WOOD, D., eds. Gel. Electrophoresis of Proteins. Eynshan, Information Printing, 1981, p. 1 - 91.
15. HANLEY, M.R. Conformation of the neurotoxic crotoxin complex and its subunits. Biochemistry, 18: 1981 - 8, 1979.
16. HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. Proc. Natl. Acad. Sciences, USA, 68(7): 1560 - 3, 1971.
17. HENDON, R.A. & TU, A.T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake. Neurotoxic action. Biochim. Biophys. Acta, 578: 243 - 52, 1979.

18. HORST, J.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. The active components of crotoxin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 46(3): 1042 - 7, 1972.
19. JENG, T.W.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75(2): 600 - 4, 1978.
20. KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.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, Gec. 9 - 13, 1974. Vienna, 1975.
21. KEMPNER, E.S. & SCHLEGEL, W. Size determination of enzymes by radiation inactivation. Analyt. Biochem., 92: 2 - 10, 1979.
22. LAYHATIRANANDA, P.; GANTHAVORN, S.; HAYDOM, V. Radiation effects on cobra venom. In: International Atomic Energy Agency. Radiation Sensitivity of Toxins and Animal Poisons: Proceedings of a Panel on..., held in Bangkok, May 19 - 22, 1969. Vienna, 1970.

23. LOWRY, 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.
24. LYNN, K.R. & RAOULT, P.D. γ -irradiation of lima bean
protease inhibitor in dilute aqueous solutions. Radiat. Res., 65: 41 - 9, 1976.
25. MARCIANI, D.J. & TOLBERT, B.M. Structural damage in
irradiated lysozyme. Biochim Biophys. Acta, 351: 387 -
95, 1974.
26. MILLER, G.L. Protein determination for large number of
samples. Analyt. Chem., 31: 964, 1959.
27. NAKAZONE, A.K.; ROGERO; J.R.; GONÇALVES; J.M. Crotoxin.
Immunology and interaction of the subunits. Braz. J. Med. Biol. Res., 17: 119 - 28, 1984.
- 28 . NAYAR, G.N.A. & SRINIVASAN, S. The effects of gama
radiation on solutions of acetylcholinesterase. Radiat. Res., 64: 657 - 61, 1975.
29. OUCHTERLONY, O. Diffusion en gel methods for immunological
analysis. Progr. Allergy, 5: 1 - 78, 1958.

30. RADVANYI, F.; ROUSSELET, A.; DEVAUX, P.; BON, C.
Interaction of crotoxin and its isolated subunits with spin-labeled fatty acids. J. Biol. Chem., 260(15): 8765 - 70, 1985.
31. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating percent endpoints. Am. J. Hygiene, 27: 493 - 7, 1937.
32. ROGERO, J.R. Toxinas do veneno de Crotalus durissus terrificus. Interação proteína-proteína e cinética de troca isotópica H.T. São Paulo, Instituto de Energia Atomica, 1979. (IEA - DT-119).
33. RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak., 270: 274 - 88, 1971.
34. SINGH, A. & SINGH, H. Time-scale and nature of radiation biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. Prod. Biophys. Molec. Biol., 39: 69 - 107, 1982.

35. SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. Memórias do Instituto Butantã, 12: 505 - 13, 1938.
36. SUNDARAM, K.; PHILIP, J.; BHATT, M.B. Radiation effects on Naja naja venom and polyvalent antisera. In: International Atomic Energy Agency. Radiation Sensitivity of Toxins and Animal Poisons: Proceedings of a Panel on... held in Bangkok, May 19 - 22, 1969. Vienna, 1970.
37. VITAL BRASIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Brasil, 26: 212 - 8, 1980.