

FRACIONAMENTO DO VENENO CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (*)

Augusta Kiyomi TAKEDA (1), Sônia França Correia BARBOSA (2), Lucinda Maria da COSTA (3) e Maria das Graças Fernandes ADELINO (4)

RESUMO

Através da técnica de cromatografia de exclusão molecular utilizando Sephadex G-75 foram estudadas as diferentes frações do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, uma das serpentes peçonhentas mais comuns no Brasil. Foram obtidos 4 picos (correspondentes às frações 32, 60, 86 e 103) com peso molecular variando de 4.000 a 150.000. As frações de todo o diagrama de gel filtração foram triadas através de reação de imunoeletroforese a fim de se verificar suas cargas e velocidade de migração. As linhas de precipitação encontradas foram comparadas às 11 linhas apresentadas pela reação de imunoeletroforese do veneno total contra o soro anti-crotálico. Constatou-se que as frações de um mesmo pico apresentavam características próprias com exceção da fração 54 (subida do pico II) que mostrou diferenças significativas em relação à fração 60. Após a triagem foram escolhidas as frações de cada pico onde as linhas de precipitação foram mais nítidas e intensas, para estudo de identidade através da reação de difusão radial dupla e letalidade comparada a concentração de 0,0625 mg/ml do veneno total que corresponde a DI_{50} em camundongo pelo método de SPEARM & KÄRBER. As frações 32, 86 e 103 correspondentes respectivamente aos picos I, III e IV apresentaram letalidade nula ou negligenciada e a fração II foi a mais tóxica.

INTRODUÇÃO

Entre muitas espécies de serpentes peçonhentas encontradas no Brasil, *Crotalus durissus terrificus*¹⁰ é uma das mais comuns. Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que 74% das vítimas sucumbem na ausência de tratamento enquanto que nos pacientes que recebem soro anti-veneno a mortalidade tende a cair para 12%⁵. A soroterapia é portanto o único meio eficaz de tratamento^{5,8,11} embora não seja possível assegurar que os diversos constituintes do veneno sejam neutralizados, devido à dose do soro anti-veneno administrada ser fixada de maneira arbitrária.

Não existem, ainda, provas de laboratório que permitam medir com segurança a concentração do veneno, tanto circulante como no tecido após o tratamento com soro anti-veneno, podendo assim assegurar a neutralização do mesmo.

De outra feita, é preocupação da Organização Mundial da Saúde o problema de reações precoces tipo anafiláticos que se observam em pessoas tratadas com soro anti-veneno, devido a fatores tais como: natureza do soro, dose, via

(*) Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

(1) Pesquisador Científico Nível V

(2) Pesquisador Científico Nível I

(3) Biologista

(4) Biologista

e modo de administração e exposição a estas substâncias sensibilizantes.

É de grande interesse o estudo das frações ou características do soro, responsáveis por estas desvantagens e, especialmente se os fatores sensibilizantes estão ou não ligados aos anticorpos protetores.

Portanto, para que se conheça melhor os aspectos acima referidos é necessário que se estude as características químicas e biológicas do veneno *Crotalus durissus terrificus* e que se obtenha um veneno padrão, que além disso possibilitará a obtenção de soros monoespecíficos eliminando acidentes indesejáveis com a administração de soros polivalentes.

Neste trabalho, propomo-nos a estudar as diferentes frações do veneno *Crotalus durissus terrificus* obtidas por gel filtração em Sephadex G-75 super fino através de imunoeletroforese, imunodifusão dupla radial e letalidade comparada com DL_{50} do veneno total em camundongos NHI-N de 15 g de acordo com o método SPERMAN & KARGER da Organização Mundial da Saúde⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregou-se 250 mg do veneno de *Crotalus durissus terrificus* obtido em 1982 (Instituto Butantan — São Paulo — Brasil) secos a vácuo e conservados a 5°C, que foram dissolvidos em 5 ml de acetato de amônia 0,2M pH 7,0. Esta amostra foi fracionada em coluna de 2,5 cm de diâmetro por 72 cm de altura com Sephadex G-75 super fino (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden). O eluente usado foi acetato de amônio 0,2M pH 7,0 e as frações de 4 ml eram coletadas em intervalos de 30 minutos por meio de um coletor automático (Toyo-SF 160K) à temperatura de 4°C. Os eluatos foram lidos a 280 nm em espectrofotômetro (Variam — Série 634 UV-VIS), tendo sido calculado o peso molecular das frações colhidas e analisadas segundo seu perfil imunoeletroforético e letalidade em camundongos. Os pesos moleculares foram estimados por gel filtração¹ usando padrões do Kit de calibração de peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden).

Imunoeletroforese

A reação de imunoeletroforese⁹ foi feita com agarose a 1% em Tampão Tris HCl pH 8,6 μ 0,6 em fonte estabilizada de eletroforese (Fanem 1050) contra tampão Tris HCl pH 8,6 μ 0,113. Foi utilizado suporte contendo 6 lâminas de 26 x 76 cm espessura 0,8 — 1,0 mm sobre o qual foram depositados 30 ml de agarose acima citada e analisando-se seis frações em cada placa. Cada fração foi testada frente ao veneno total na concentração de 10 mg/ml. O tempo de corrida foi de 50 minutos com corrente de 10 mA colocando-se em seguida o soro anti-veneno crotálico do Instituto Butantan, lote 8210003, deixando-se por 20 horas em difusão em câmara úmida.

A análise de identidade das linhas de precipitação das frações foi feita utilizando-se placa de imunoeletroforese de 18 x 11 cm em 40 ml de agarose corridas durante 1:30 hs com 20 mA e difusão de 48 hs e reação de imunodifusão.

Todas as reações foram coradas com negro de amido.

Reação de difusão radial dupla²

Realizada em placa de Petri, nas quais foram colocadas 10 ml de agarose 1% em solução fisiológica 0,85%. Os orifícios mediam 8 mm de diâmetro, contendo 70 μ l das frações a serem analisadas e do veneno crotálico total nas concentrações de 1mg/ml. No orifício central foi colocado soro anti-crotálico do Instituto Butantan sem diluir. As placas foram deixadas por 48 horas em câmara úmida e coradas com negro de amido 1%.

Letalidade

A DL_{50} do veneno crotálico total foi calculada em camundongos NHI-N (Instituto Adolfo Lutz — São Paulo — Brasil) de 15 g pelo método de SPEARM & KÄRBER⁴.

As frações analisadas foram inoculadas em concentrações próximas à concentração obtida na DL_{50} em camundongos da mesma cepa, pelo método acima.

RESULTADOS

Através da técnica de fracionamento em Sephadex G-75 super fino foram obtidos 4 picos (frações n.º 32, 60, 86 e 103) cujos pesos moleculares foram de 150.000, 39.000, 10.000 e 4.000 respectivamente (Fig. 1). Estas mesmas frações foram analisadas através da técnica de imunoelektroforese, com a finalidade de se estudar

quanto à sua pureza, carga e velocidade de migração, tomando como parâmetro o veneno bruto ou total (Figs. 2 e 3). Constatou-se que as frações de um mesmo pico possuem características próprias com exceção da fração 54 que mostrou diferenças significativas quando comparada a da fração 60, do mesmo pico. De acordo com esta técnica foi verificada a existência no veneno bruto, de 11 linhas de precipitação.

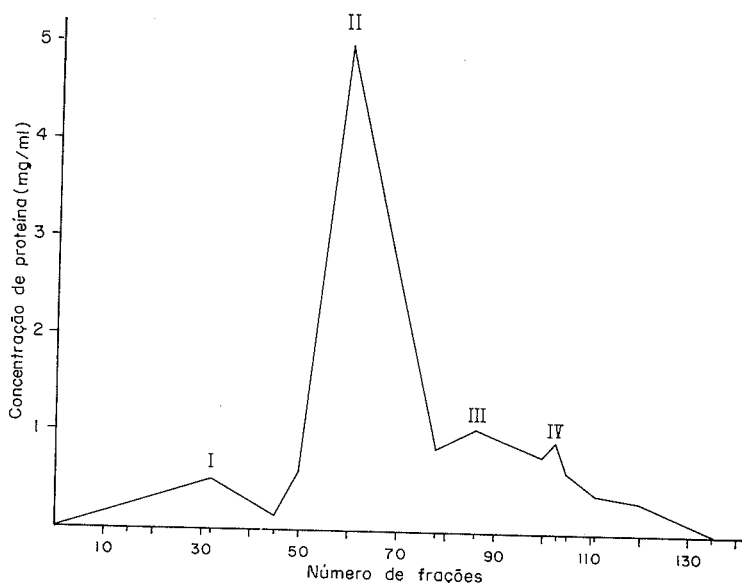


Fig. 1 — Diagrama de gel filtração em Sephadex G-75 super fino do veneno total do *Crotalus durissus terrificus*

A fração número 32 apresenta 2 linhas de precipitação sendo que uma delas migra para a região do cátodo e a outra permanece no ponto de aplicação. Na fração número 54 foram detectadas 4 linhas de precipitação correspondentes às linhas 2, 8, 9 e 11 do veneno bruto. A fração 60 apresenta 3 linhas, sendo que a 11 e 9 foram comuns à fração 54; porém, apresentou a linha n.º 5 não encontrada nas demais. A fração 86 apresentou, além da linha n.º 11 comum às frações 54 e 60, as linhas específicas n.º 3 e 4. Finalmente, a fração 103 apresentou uma única linha, a número 1.

A Fig. 3 mostra as linhas de precipitação de cada fração correlacionando-as com as obtidas do veneno total frente ao soro anti-crotálico.

A reação de imunodifusão radial dupla das frações contra o soro anti-crotálico, confirma os dados obtidos na reação de imunoelektroforese,

quanto a características próprias das mesmas (Fig. 4).

As linhas de precipitação da fração 32 não mostram identidade com nenhuma outra fração (Fig. 4A). Já a fração 54 apresenta duas linhas de precipitação com identidade total com as linhas da fração 60, sendo que uma delas também apresenta esta identidade com a linha apresentada pela fração 86, possivelmente sendo a linha n.º 11 observada na reação de imunoelektroforese.

As frações que apresentaram na reação de imunoelektroforese linhas de precipitação nas mesmas regiões não apresentaram nenhum tipo de identidade fora as acima mencionadas (Figs. 4B e C).

Quanto à letalidade das frações (Tabela II), comparada com a DL_{50} do veneno bruto (0,0625 mg/ml) em camundongo de 15 g foi observado

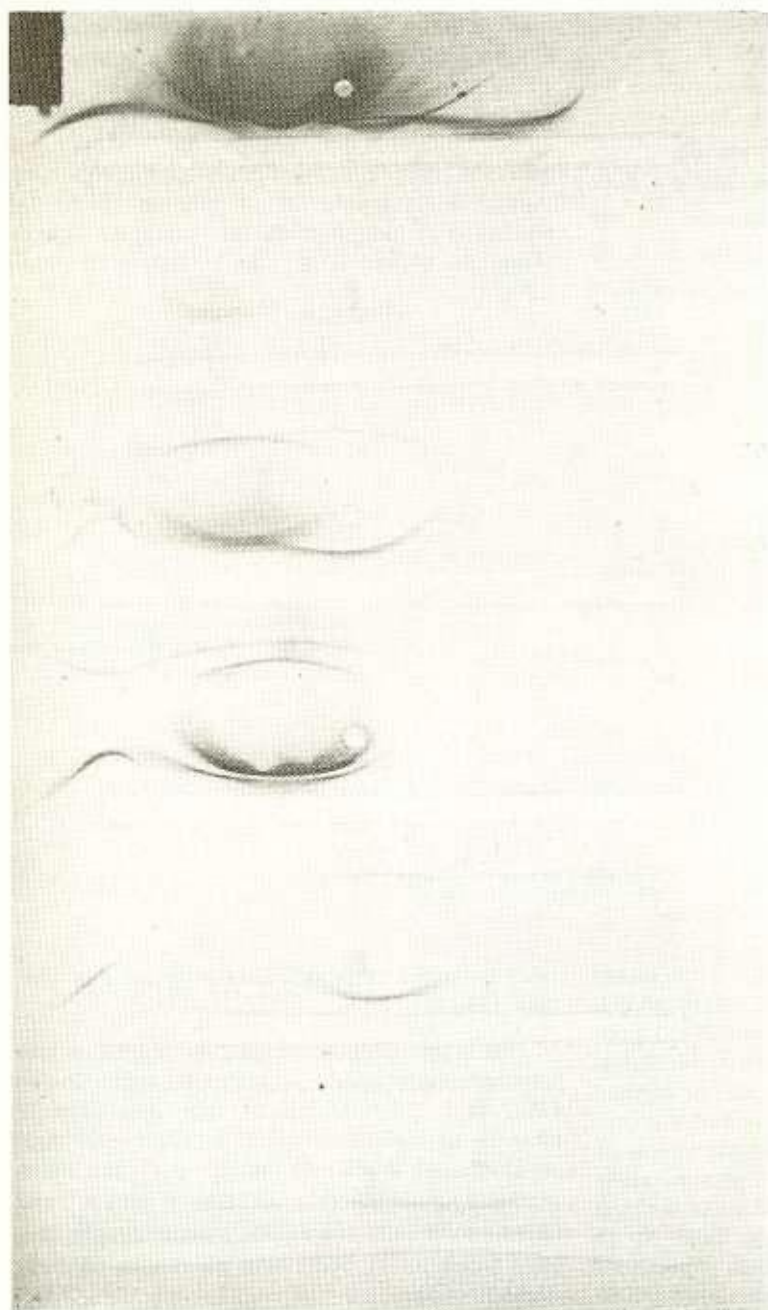


Fig. 2 — Placa das imunoelectroforeses (em placas de 11 x 18 cm) do veneno crotálico total e das frações 32, 54, 60, 85 e 103 frente ao soro anti-crotálico do Instituto Butantan, onde são analisadas as características imunoelectrolíticas de cada fração.

um alto poder letal nas frações 54 e 60, ambas pertencentes ao pico II responsável pela mortalidade de todos os animais, a 1.ª em 3 horas e a 2.ª num período de 18 horas. A fração 103 do pico IV mostrou letalidade bastante reduzida, pois ocorreu apenas um caso de óbito após a inoculação de uma concentração de 0,0906 mg/ml no período de 2 horas e outro com

menor concentração (0,0629 mg/ml) 18 horas após. Todos os sobreviventes foram observados por 72 horas.

DISCUSSÃO

Os venenos de animais peçonhentos apresentam grandes concentrações de enzimas e de

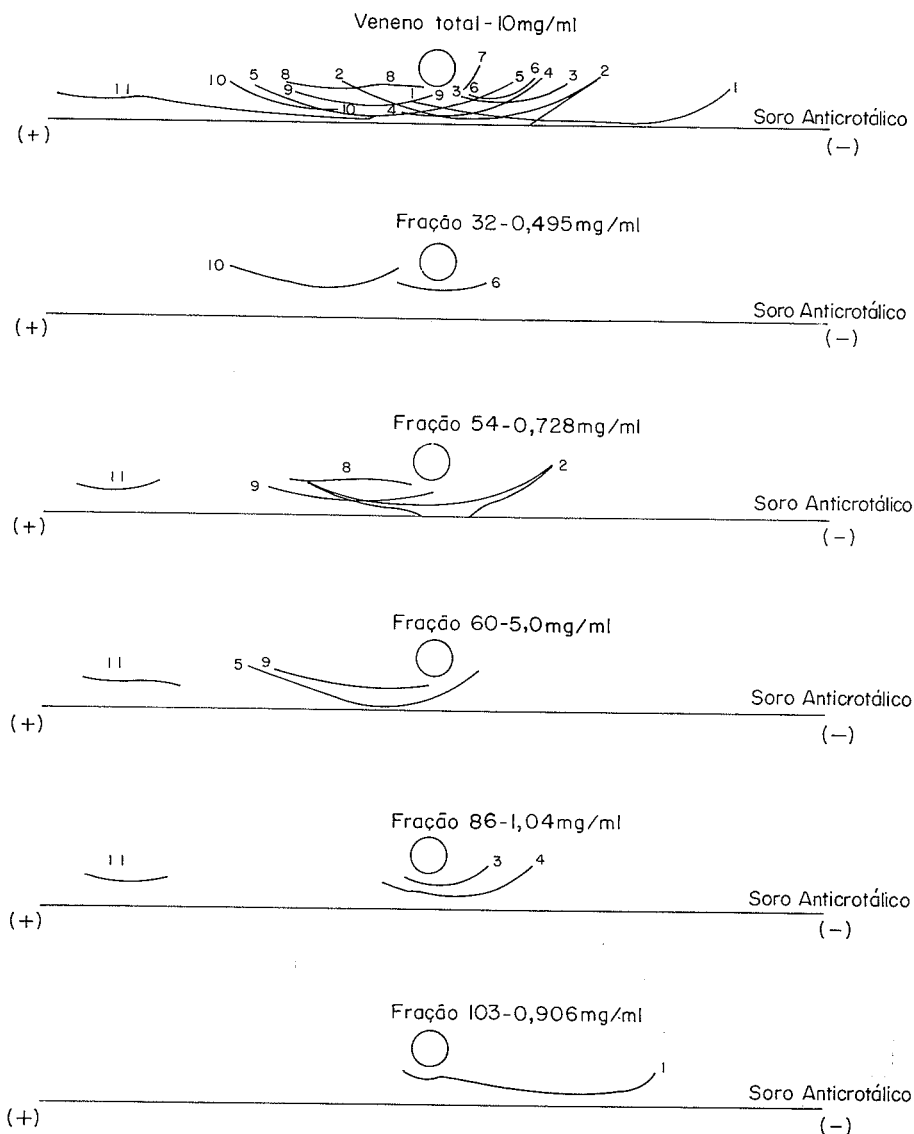


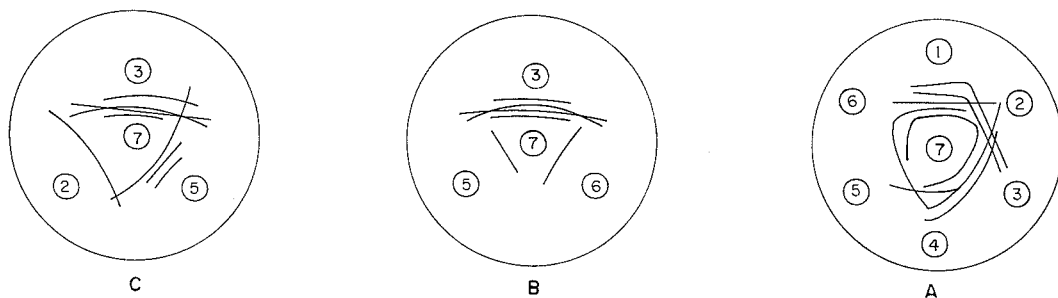
Fig. 3 — Esquema das linhas de precipitação das imunoelctroforeses do veneno crotálico total (10 mg/ml) e das frações 32, 54, 60, 86 e 103 nas respectivas concentrações do eluato correspondente, frente ao soro anti-crotálico do Instituto Butantan

outros componentes que são bastante hábeis em solução; logo, as técnicas de separação que melhor se adaptam a estas características são as de exclusão molecular em Sephadex².

GRILLO & SCANONE⁶ utilizando o Sephadex G-100 para fracionar o veneno do *Crotalus durissus cumanensis*, conseguiu obter em um diagrama de fracionamento vários picos, sendo que as frações de mais alta letalidade foram encontradas em três deles com peso molecular iguais a 25.000, 14.500 e 5.200.

Os picos de altos PM (150.000 e 90.000) nos quais se concentram a maioria das enzimas, não apresentaram atividade tóxica, o mesmo acontecendo com componentes dos picos de pesos moleculares menores (5.000).

No presente trabalho encontramos atividades letais nas frações com PM de 30.000, sendo que nas demais a letalidade foi nula, ou negligenciável como a observada nos de PM igual a 4.000.



- 1 VENENO CROTÁLICO TOTAL (1mg/ml)
- 2 FRAÇÃO 32 (1mg/ml)
- 3 FRAÇÃO 54 (1mg/ml)
- 4 FRAÇÃO 60 (1mg/ml)
- 5 FRAÇÃO 86 (1mg/ml)
- 6 FRAÇÃO 103 (1mg/ml)
- 7 SORO ANTICROTÁLICO

Fig. 4 — Esquema das reações de imunodifusão radial dupla

A) Comparação das frações 32, 54, 60, 86 e 103 e do veneno total nas concentrações de 1 mg/ml frente ao soro anti-crotálico do Instituto Butantan;

B) Comparação das frações 54, 86 e 103 nas concentrações de 1 mg/ml frente ao veneno anti-crotálico do Instituto Butantan;

C) Comparação das frações 32, 54 e 86 nas concentrações de 1 mg/ml frente ao soro anti-crotálico do Instituto Butantan.

T A B E L A I

Linhas de precipitação observadas na reação de imunoeletroforese

		Nº de linhas de precipitação do veneno bruto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PICO I	FRAÇÃO 32						///				///	
PICO II	FRAÇÃO 54		///						///	///		///
	FRAÇÃO 60					///				///		///
PICO III	FRAÇÃO 86			///	///							///
PICO IV	FRAÇÃO 103	///										

O veneno total apresentou, frente ao soro anti-crotálico, 11 linhas de precipitação com cargas e velocidades de migração diferentes.

As frações não tóxicas corresponderam as linhas 3, 4, 6, 10 e 11 e, às tóxicas provavelmente as linhas 2, 5, 8 e 9.

Possivelmente as frações responsáveis por formação de anticorpos protetores seriam as dos determinantes antigênicos que reagiram com o soro anti-crotálico dado as linhas de precipitação 2, 8 e 9, pois a fração que as contém, a de n.º 54, é mais tóxica que a 60, uma vez que a linha 2 é mais imunogênica e a linha 9 está presente nas duas frações tóxicas.

Os dados de imunoeletroforese foram confirmados pela imunodifusão radial dupla, sendo verificado que as duas frações com atividade letal (54 e 60) apresentaram identidade total em 2 linhas, uma das quais correspondendo a linha de número 11, pois apresentara identidade total com uma das linhas da fração 86.

Diante destes dados obtidos estamos no presente momento inoculando coelhos para obtenção de anti-soro específico para as frações 54 e 60, a fim de estudar melhor a atividade imunogênica e protetora.

Isto será de grande ajuda para obtenção de soros hiperimunes específicos, além de poder

T A B E L A II

Letalidade das frações 32, 54, 60, 86 e 103 em camundongos NHI-N de 15 g comparada a DL₅₀ de 0,0625 mg/ml, pelo método de SPEARM & KÄRBER

Número das frações	Concentração proteica em mg/ml	N.º de camundongos inoculados	Tempo de sobrevivência, observação em:				
			2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
P I C O I	0,082	6	—	—	—	—	—
32	0,0675	6	—	—	—	—	—
	0,0572	6	—	—	—	—	—
	0,0728	6	4	2	—	—	—
54	0,0505	6	1	5	—	—	—
P I C O O II	0,0421	6	1	5	—	—	—
	0,0783	6	—	6	—	—	—
60	0,065	6	—	6	—	—	—
	0,054	6	—	—	6	—	—
P I C O III	0,072	6	—	—	—	—	—
86	0,060	6	—	—	—	—	—
	0,050	6	—	—	—	—	—
P I C O IV	0,0906	6	1	—	—	—	*—
103	0,0629	6	—	—	1	—	—
	0,0524	6	—	—	—	—	—

* 2 animais apresentaram sintomas

padronizar melhor o veneno para ser utilizado não só no controle dos soros hiperimunes como também medir a concentração de veneno no sangue circulante e poder orientar melhor a clínica terapêutica.

SUMMARY

Fractionation of *Crotalus durissus terrificus* of chromatography technique by molecular exclusion

By means of chromatography technique by molecular exclusion using Sephadex G-75 were studied different fractions of venom *Crotalus durissus terrificus*, one the most common poisonous snakes in Brazil.

It were obtained four peaks related to fractions 32, 60, 86 and 103, which molecular weight varied from 4.000 to 150.000.

The fractions of all gel filtration diagram were screened through immunoelectrophoresis, in order to verify its charges and migration speed. The precipitation lines were compared with 11 lines obtained through immunoelectrophoresis of total venom against anti-*Crotalus durissus terrificus* serum. It was observed that fractions of same peak presented peculiar characteristics except fraction 54 (corresponding to the ascending of peak II), which showed significant differences when compared with fraction 60.

After screening, fractions of each peak were chosen in order to identify means of double radial diffusion test and the letality was compared with 0,0625 mg/ml concentration of total venom, which corresponds to DL₅₀ in mice by SPEARM & KÄRBER method.

Fractions 32, 86 and 103 corresponding to peaks I, III and IV respectively, presented null

or negligibe lethality, and fraction II was the most toxic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANDREWS, P. — Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Meth. Biochem. Anal.* 18 (pte. 1): 26-29, 1970.
2. BERINE, H. B. — Descephant equations derived from the single radial immunodifusion technique. *Immunochimistry* 8: 1256-1259, 1972.
3. BRAZIL, V. A. — *A Defesa Contra o Ofidismo*. São Paulo, Pocaí & Weiss, 1911, 152 p.
4. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD — *Curso internacional sobre produccion y control de obrologicos*. México, O.M.S., 1978, p. 1-8.
5. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — *Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: progrès réalisés*. Genève, O.M.S., 1981, 49 p. (OMS Publication offset, 58).
6. GRILLO RODRIGUES & SCANNONE, H. R. — Fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom by gel filtration. *Toxicon* 14: 400-403, 1976.
7. PIZA JR., S. T. — As cobras venenosas e o problema ophídico em São Paulo. *Bol. Agric. Série 31* (5/6): 307-389, 1930.
8. PORATH, J. — Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 39: 193-207, 1960.
9. RUSSEL, W. Y. — In analysis of certain factors related to the quantitation of immunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 94: 942-949, 1965.
10. SILVA JR., M. — *O Ofidismo no Brasil*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956, 350 p.
11. STANKE, H. L. et al. — Pre treatment of snakebite. *Amer. J. Trop. Med.* 6: 323-335, 1957.

Recebido para publicação em 5/6/1984.