

PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ESPECÍFICO
PARA A CROTOXINA

R. Hertel

RUTH HERTEL

PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ESPECÍFICO PARA A CROTOXINA

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientadora: Profa. Dra. J.P. Franceschi

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas - São Paulo

(1977)

UNICAMP
CENTRO DE CIÊNCIAS

Aos meus pais

e

irmã.

AGRADECIMENTOS

À Professora Julia Prado Franceschi, orientadora desta, pela dedicação maternal, estímulo e ensinamentos científicos, que possibilitaram este trabalho.

Ao Professor Oswaldo Vital Brazil, pelo incentivo e confiança que depositou em nossa iniciação científica.

Ao Professor José Moura Gonçalves e seus assistentes, Atsuko, José Roberto, Suemi e Nêli-da, pelo carinho com que nos receberam, pelo auxílio prestado na marcação da crotoxina e, ainda, pelas críticas e sugestões.

Ao Professor Humberto de Araújo Rangel, pela orientação, críticas e sugestões na análise dos resultados e técnicas imunológicas utilizadas neste trabalho.

Ao Professor Walter August Handler, em nome do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Aos Professores Aldo Focesi Jr. (Departamento de Bioquímica), Fajga Ruchla Mandelbaum (Diretora do Serviço de Bioquímica, Instituto Butantan), Humberto de Araujo Rangel (Departamento de Microbiologia e Imunologia) e Luiz Sebastião Prigenzi (Departamento de Clínica Médica), pelas críticas e sugestões que influenciaram a re-

dação final desta Tese.

Aos Colegas do Departamento de Farmacologia, pela maneira como nos receberam e pela solidificação da amizade em nosso convívio diário.

À amiga Maria Carolina dos Santos, pelo esmero e dedicação no trabalho de datilografia.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia.

À Maria de Jesus F. de Carvalho, pela sua dedicada contribuição na elaboração dos gráficos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, que contribuíram para a implantação do nosso espírito científico.

Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, pelo espírito de colaboração e companheirismo.

Ao Dr. Newton Pereira Santos, Chefe do Laboratório de Concentração de Soros do Instituto Butantan, que nos forneceu o soro anticrotálico.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| - INTRODUÇÃO | 1 |
| - MATERIAL E MÉTODOS | 7 |
| - RESULTADOS | 19 |
| 1. Obtenção e cristalização da crotoxina | 19 |
| 2. Titulação do antissoro crotálico | 28 |
| 3. Purificação do anticorpo | 32 |
| 4. Purificação do anticorpo obtido pela reação da crotoxina cristalizada marcada com I^{131} x soro anticrotálico | 37 |
| 5. Purificação do anticorpo específico para a crotoxina por afinidade cromatográfica | 39 |
| - DISCUSSÃO | 44 |
| - CONCLUSÕES | 50 |
| - RESUMO | 51 |
| - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |

INTRODUÇÃO

Crotoxina, o principal componente da peçonha da cascavel sul-americana, tem sido objeto de inúmeras pesquisas.

Isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938), foi considerada pura quando examinada pelos métodos de Cohn (Slotta e Fraenkel-Conrat, 1938), eletroforese (Li e Fraenkel-Conrat, 1942) assim como por sedimentação e difusão em ultracentrífuga (Gralén e Svedberg, 1938). Por este método de ultracentrifugação também foi determinado seu peso molecular que é de 30.000. Por longo tempo, foi tida como protótipo de proteína homogênea e cristalizável, apresentando diferentes propriedades: neurotóxica e fosfolipásica A.

A reinvestigação desta "enzima tóxica" tornou-se necessária quando a atividade neurotóxica e fosfolipásica em peçonhas de abelhas e em venenos de Cobra (Naja naja) foram atribuídos a diferentes constituintes (Habermann, 1968).

Neumann e Habermann, em 1955, tentaram separar as duas atividades, baseando-se nos resultados obtidos com peçonhas de abelhas, em resina de troca iônica (Amberlite IRC-50). Obtiveram a crotactina e a fosfolipase A. Verificaram que a crotactina tinha a mesma toxicidade

dade do que a crotoxina e atividade fosfolipásica cerca de 10% menor que a do veneno total, fatos que a indicavam como o principal componente tóxico da peçonha da cascavel (Habermann, 1957).

Em 1956, Fraenkel-Conrat e Singer e em 1970 Hendon et al., bloquearam os aminogrupos livres da crotoxina, com FDNB (flúor dinitro benzeno) e anidrido maleico ou metil maleico, respectivamente. A separação em frações, tendo como critério a solubilidade em água, revelou que o componente solúvel continha menor quantidade de aminoácidos básicos do que o componente insolúvel.

A separação da crotoxina em cromatografia por troca iônica (CM-celulose e DEAE-celulose) em várias frações foi obtida por dois grupos de pesquisadores, o da Universidade Justus-Leibig, Giessen, Alemanha (Rübsamen et al., 1971; Habermann e Rübsamen, 1971; Breithaupt et al., 1971) e o da Universidade da Califórnia, Berkeley, Estados Unidos (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971). Os principais componentes foram identificados como uma fosfolipase A, fortemente básica com toxicidade relativamente baixa e a crotapotina, uma proteína ácida, livre de atividade nos ensaios usados. A recombinação das duas proteínas em determinadas proporções (Rübsamen et al., 1971; Breithaupt et al., 1974; Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971), tornou possível a reconstituição da toxicidade inicial da crotoxina. Além disso foi verificado que a crotapotina não tinha toxicidade nem atividade enzimática, mas influenciava ambas de forma dife-

rente, potenciando a baixa toxicidade da fosfolipase A e inibindo a sua atividade enzimática "in vitro".

Embora a descoberta de Slotta e Fraenkel-Conrat date de 1938, os dados existentes até 1966 sobre a farmacologia da crotoxina eram escassos.

Vital Brazil e seus colaboradores preencheram esta lacuna, esclarecendo aspectos concernentes à toxicidade (Vital Brazil et al., 1966a), ação neuromuscular (Vital Brazil, 1966; Vital Brazil, 1971), cardiovascular e respiratória (Vital Brazil et al., 1966b) e nefrotóxica (Vital Brazil e Hadler, 1966). Além disso, Vital Brazil et al. (1973) demonstraram que a paralisia respiratória causada pela crotoxina é de origem periférica, sendo atribuível à sua ação bloqueadora neuromuscular.

Em 1969, Gomes Lomba estudou a absorção, distribuição e excreção da crotoxina cristalizada marcada com I^{131} , verificando inicialmente que a marcação da crotoxina não interferia, nem com suas propriedades tóxicas nem com sua capacidade de reagir com o soro. A observação de que a crotoxina atingia concentrações relativamente altas nos músculos e extremamente baixas no líquor e cérebro, levaram o autor a afirmar que esta toxina era incapaz de atravessar as barreiras hematoencefálica e hematoliquórica e atingir o sistema nervoso central. Os rins foram os órgãos nos quais se detectaram os maiores índices de atividade específica, justificando a presença de lesões degenerativas e necróticas (Vital Brazil e Hadler, 1966) das células

renais. Em experiências em que os cães eram previamente tratados com soro anticrotálico, a distribuição da radioatividade alterou-se, sendo o baço o órgão que apresentou o maior índice de radioatividade. Nos rins houve uma redução de 7,6 vezes.

Em fins do século passado, Henry Sewell (1887) mostrou que a inoculação repetida da peçonha de uma pequena cascavel norte americana produzia, em pombos, um aumento contínuo da resistência aos seus efeitos tóxicos. Coube a Physalix e Bertrand e a Calmette demonstrar simultaneamente em 1894, que o soro dos animais assim tratados, exercia atividade antitóxica em relação à peçonha. Como corolário destas verificações, a soroterapia anti-ofídica foi lançada por Calmette. Contudo, sustentava o famoso cientista do Instituto Pasteur de Lille, que o soro obtido de animais imunizados com a peçonha da Cobra Capelo da Índia (Naja naja) era capaz de neutralizar toda e qualquer peçonha ofídica*. Coube a Vital Brazil demonstrar, em 1901 e 1903, pela primeira vez, que as peçonhas ofídicas são imunologicamente específicas e que, em venenos de espécies próximas, pode se observar, em certos casos, uma "ação paraespecífica" importante (Brazil, V., 1903). Baseado em suas pesquisas pôde Vital Brazil instituir em nosso país, a partir de

* "le sérum d'un lapin immunisé contre le venin de cobra ou de vipere agit indifféremment sur tous les venins que j'ai expérimentés."

(Calmette, 1894).

1902, a soroterapia antiofídica em bases realmente científicas e eficazes.

A especificidade imunológica das peçonhas ofídicas foi amplamente confirmada por Lamb e Hanna em 1903 e 1904, Tidswell em 1906 e Arthus em 1912. Contudo, são quase inexistentes estudos imunológicos de componentes separados dos vários venenos ofídicos. Com relação aos da cascavel sul-americana, apesar das pesquisas bioquímicas e farmacológicas acima referidas sobre a crotoxina e a existência de trabalhos sobre a separação e farmacologia de outros constituintes deste veneno, pouco se sabe relativamente a seus aspectos imunológicos.

O objetivo deste trabalho foi o de purificar o anticorpo específico para a crotoxina por ser esta o principal componente da peçonha da cascavel sul-americana, não apenas pela sua toxicidade (Vital Brazil, 1972), mas pelo seu elevado teor na peçonha. Ao tentarmos purificar o anticorpo, tivemos em mira obter instrumento valioso para o estudo da participação das demais toxinas na fisiopatologia do envenenamento crotálico. Além disso, a grande quantidade de crotoxina presente na peçonha, faz com que essa toxina seja um contaminante que dificulta o isolamento e a purificação das demais. A utilização do anticorpo purificado poderá facilitar sobretudo a obtenção destes constituintes.

Para a obtenção do anticorpo específico para a crotoxina, foram utilizados dois métodos de

purificação: por dissociação do complexo AgAc e por cromatografia de afinidade.

Inicialmente baseamo-nos nos trabalhos de Chang e Yang, os quais, em 1969 e 1972, estudaram a imunquímica da cobrotoxina (Naja naja atra), demonstrando ser possível a obtenção da antineurotoxina em estado de pureza a partir do complexo neurotoxina-antineurotoxina.

Posteriormente, utilizamos a cromatografia por afinidade específica (Cuatrecasas, 1970; Porath et al., 1967), para purificação do anticorpo. Esta é uma técnica recente, que está sendo empregada no isolamento e purificação de enzimas (Cuatrecasas e Anfinsen, 1971a e 1971b), anticorpos (Cuatrecasas e Anfinsen, 1971a e 1971b ; Porath et al., 1967; Axen e Porath, 1967) e hormônios (Guyda e Friesen, 1971; Hwang et al., 1974).

MATERIAL E MÉTODOS

ANTÍGENO (crotoxina):

Foram utilizados dois métodos de fracionamento por precipitação com sulfato de amônio na obtenção do antígeno, a partir de um "pool" de peçonha da cascavel sul-americana.

MÉTODO I:

A crotoxina foi isolada de acordo com o método de Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) modificado. Dissolveu-se 1,0 g de peçonha em 100 ml de soro fisiológico pH 6,0, adicionando-se lentamente, sob agitação contínua, 80 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 6,0. O precipitado, separado do sobrenadante por centrifugação, foi suspenso e dialisado em água desionizada até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. O precipitado que apareceu após a diálise (F_1) foi separado do sobrenadante (S_1) por centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados lentamente e sob agitação contínua, 39 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 4,2. O precipitado separado do sobrenadante por centrifugação foi submetido ao mesmo tratamento descrito acima. O precipitado obtido após a diálise foi denomina-

do de F_{II} e o sobrenadante S_{II} . O sobrenadante resultante da segunda precipitação com o sulfato de amônio foi submetido a nova precipitação com 45 ml de solução saturada deste sal em pH 4,4. O precipitado, separado por centrifugação, foi suspenso e dialisado em água desionizada até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. O dialisado foi centrifugado para separação da porção solúvel em água (S_{III}) da porção insolúvel (F_{III}). As frações II e III correspondem à crotoxina amorfa. O procedimento acima descrito acha-se resumido na Fig. 1.

MÉTODO II:

Dissolveu-se 1,0 g de peçonha em 100 ml de soro fisiológico pH 8,0, adicionando-se 25,0 g de sulfato de amônio finamente pulverizado, lentamente e sob agitação contínua. O precipitado formado foi separado do sobrenadante por centrifugação. O precipitado foi suspenso e dialisado em água desionizada até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. O dialisado continha um precipitado F_I e um sobrenadante S_I . Ao sobrenadante de pH 6,5, foram adicionados, lentamente e sob agitação contínua, 5,0 g de sulfato de amônio finamente pulverizado. O precipitado separado do sobrenadante foi suspenso e dialisado em água desionizada até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. A porção solúvel do dialisado (S_{II}) foi separada da porção inso

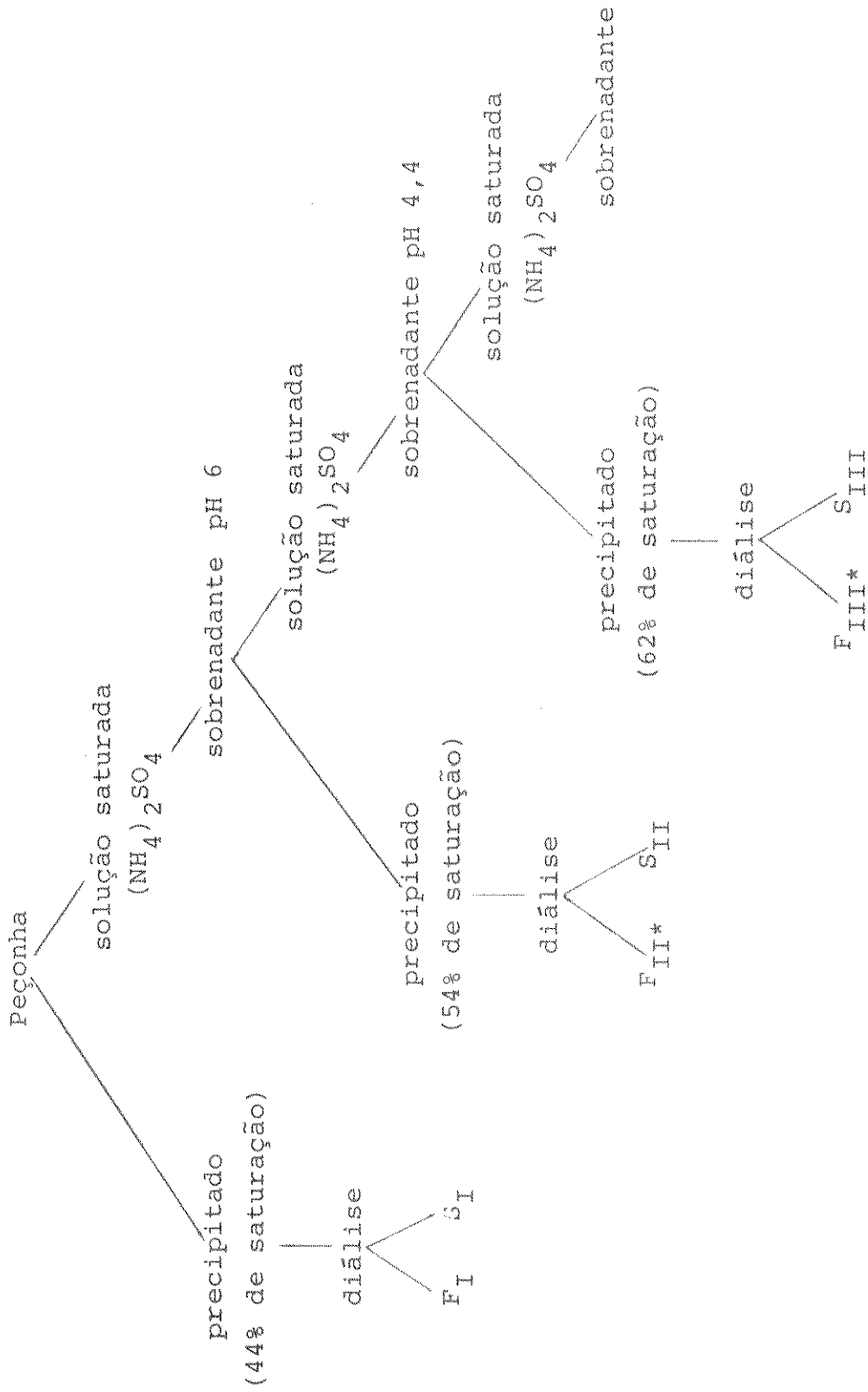


Figura 1 - Esquema do fracionamento por precipitação, com solução saturada de sulfato de amônio, da peçonha da cascavel sul-americana. (*) Crotoxina amorfa.

lúvel (F_{II}) por centrifugação. O sobrenadante foi ajustado a pH 4,4, adicionando-se após o ajuste, 5,0 g de sulfato de amônio finamente pulverizado. O precipitado e o sobrenadante foram dialisados em água desionizada, até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. O dialisado foi centrifugado para separação da porção solúvel (S_{III}) da insolúvel (F_{III}). As etapas deste fracionamento foram realizadas em banho de gelo. As frações II' e III' correspondem à crotoxina amorfa. O processo acima descrito acha-se resumido na Fig. 2.

CRISTALIZAÇÃO:

A crotoxina foi cristalizada pelo método descrito por Fraenkel-Conrat (1938), com modificações nas quantidades dos reagentes. Na Fig. 3 acha-se representada a titulação do ácido acético a 1% com a piridina a 1%. Esta titulação foi necessária para verificação das quantidades dos reagentes a serem usadas na obtenção do pH ótimo que está em torno de 4,7. Um "pool" de 300 mg de crotoxina amorfa foi dissolvido durante aproximadamente 30 minutos, a uma temperatura de 55°C, em 3,5 ml de ácido acético a 1% e após dissolução, adicionou-se, sob agitação lenta, 2,9 ml de piridina a 1%. A mistura foi conservada em geladeira até o dia seguinte e o precipitado formado foi separado por centrifugação e lavado por duas vezes em água desionizada.

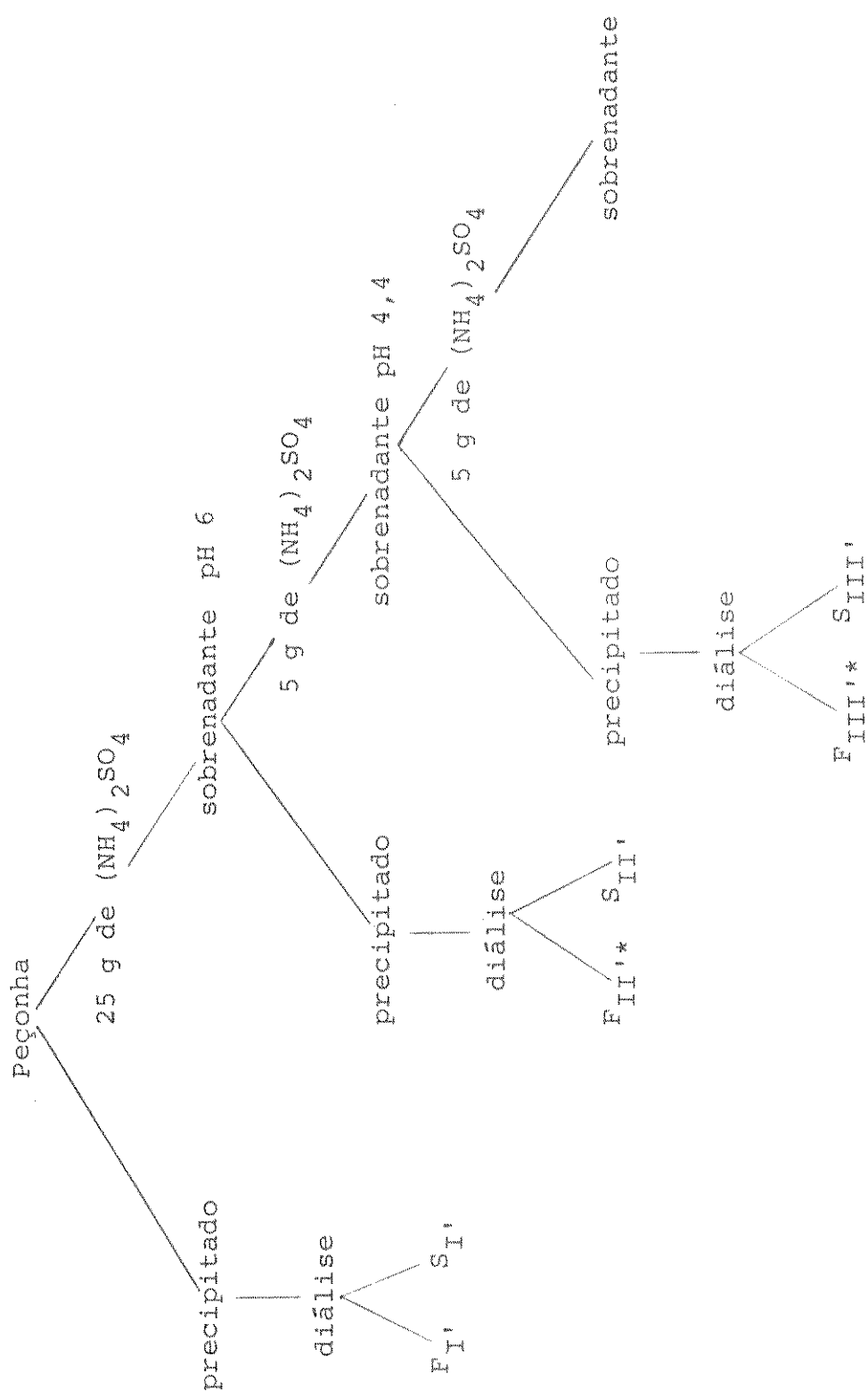


Figura 2 - Esquema do fracionamento por precipitação com o sal de sulfato de amônio finamente pulverizado, da peçonha da cascavel sul-americana. (*) Crotoxina amorfa.

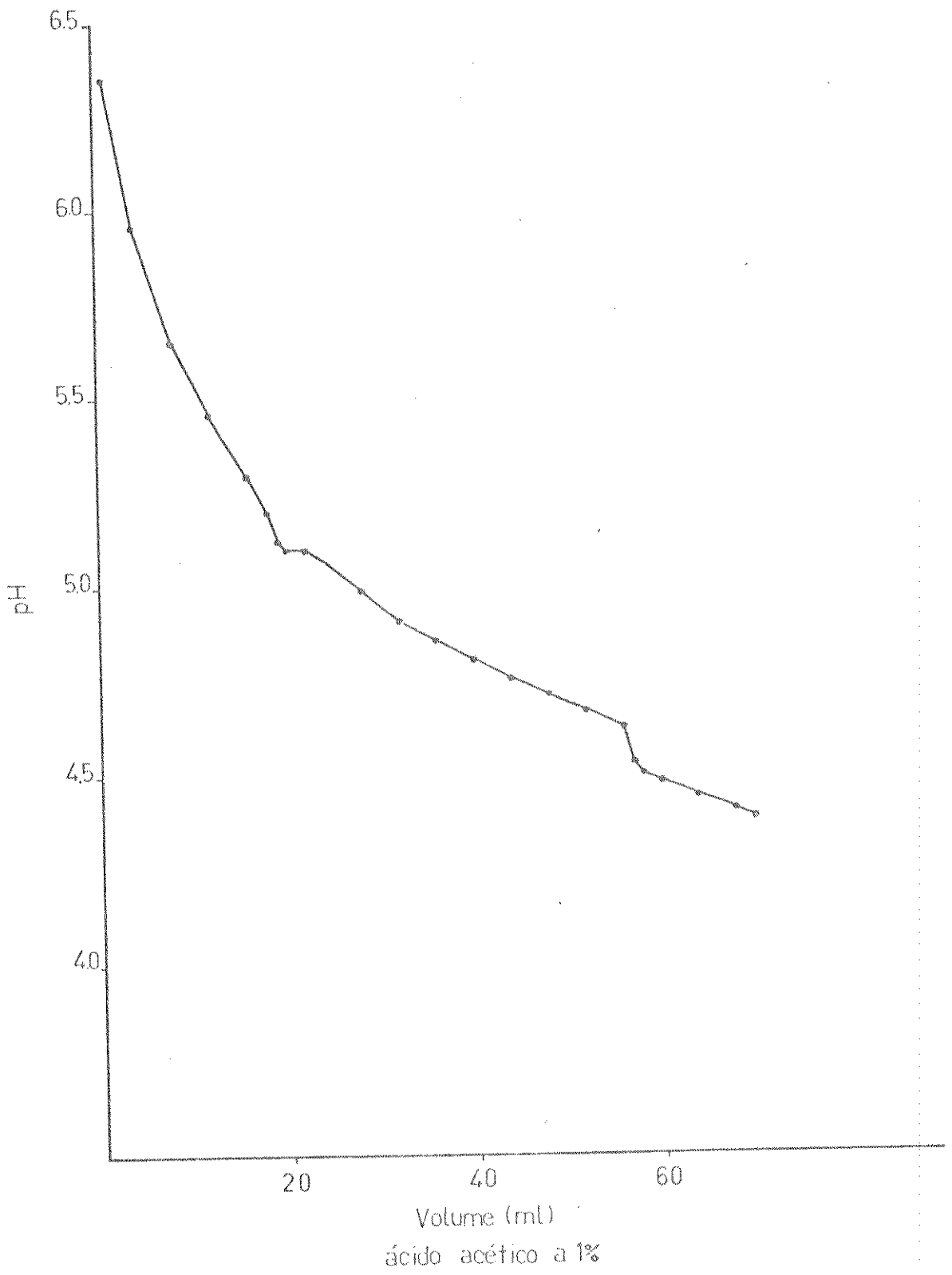


Figura 3 - Curva de titulação de 50 ml de piridina a 1% com ácido acético a 1%.

TOXICIDADE:

As determinações da DL50 da crotoxina amorfa e cristalizada foram realizadas em camundongos de 17,0 a 21,0 g, utilizando-se seis animais por dose. As doses administradas por via venosa, contidas em um volume de 0,5 ml estavam entre si numa progressão geométrica de razão igual a 1,5. O processo de Weill (1952) foi usado para os cálculos da DL50 e de seus intervalos de confiança a nível de 95%.

MARCAÇÃO DA CROTOXINA COM I¹³¹:

A marcação da crotoxina obedeceu a técnica de Greenwood et al. (1963), que será descrita a seguir. Para 50 µl de ¹³¹INa contendo uma radioatividade de 2 mCi, adicionou-se 25 µl de tampão fosfato pH 8,0 0,05 M, cloramina T 30 mg/200 µl (para oxidar o iodeto a iodo) e 25 µl de uma solução de crotoxina a 4 mg/ml. Após um minuto de reação juntou-se metabissulfito de sódio 17 mg/100 µl (para neutralizar o excesso de cloramina T). Esta mistura foi transferida para uma coluna de Sephadex G-25 previamente equilibrada em tampão fosfato 0,05 M pH 8,0, para separar a crotoxina marcada do iodo livre.

RADIOATIVIDADE:

A radioatividade foi determinada em contador gama de poço cristal NaI, Nuclear Chicago (Searle), 1185 Series Automatic gamma counting system. As determinações também foram realizadas no Mediac Dose Calibrator, model 6372 Nuclear Chicago Corporation.

ANTICORPO

O anticorpo específico para a crotoxina foi preparado a partir do soro anticrotálico (sb_1) cedido pelo Instituto Butantan, purificado pela pré-digestão enzimática (pepsina) seguida da precipitação do anticorpo com sulfato de amônio.

GEL FILTRAÇÃO:

A gel filtração em Sephadex (Pharmacia Upsala, Sweden) foi realizada de acordo com as instruções fornecidas por Flodin (1962). Os tampões utilizados foram preparados segundo Gomori (1965).

DOSAGEM DE PROTEINAS:

O teor de proteínas foi determinado pelo reativo do biureto segundo Weichselbaum (1964) e pela absorvância no comprimento de onda de 280 nm em um espectrofotômetro Carl Zeiss PMQ III, utilizando-se cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

IMUNODIFUSÃO:

Dupla difusão foi executada segundo a técnica de Ouchterlony (1967). "Purified agar" (Difco) foi dissolvido para uma concentração final de 1% em meio salino isotônico de pH 6,5 - 6,8. Após a difusão em temperatura ambiente por 24/48 horas em câmara úmida e lavagem com cloreto de sódio 0,1 M para remoção de proteínas solúveis, as lâminas foram coradas com negro de amido.

ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE:

O estudo eletroforético foi baseado nos trabalhos de Grabar e Williams (1953), nas seguintes condições: "purified agar" (Difco) a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8,4. Nas cubas foi utilizado o mesmo tampão de força iônica 0,05 M pH 8,4. A diferença de potencial utilizada foi de 3 V/cm durante 2 horas. As imunoeletroforeses

foram realizadas conforme as indicações de Grabar e Burtin (1964).

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL:

A separação eletroforética em primeira dimensão foi feita aplicando-se 5 μ l do Ag a 10 mg/ml num poço de 2,5 mm de diâmetro em placas de vidro de 12 x 9 cm contendo agarose a 1% em tampão veronal 0,05 pH 8,6. O mesmo tampão foi utilizado nas cubas. Foi aplicada uma diferença de potencial de 5 V/cm por 60 minutos. Após este tempo, uma faixa de agarose foi cortada e aplicada em seu lugar 4 ml de solução de antisoro diluída a 1/20 em agarose. Após a solidificação, foi aplicada uma diferença de potencial de 2 V/cm por 18 horas, numa segunda dimensão. As lâminas foram tratadas, a seguir, segundo os procedimentos descritos por Clarke (1971).

PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO:

A precipitação em meio líquido foi levada a efeito de acordo com o método de Heidelberger e Kendal (1935), segundo instruções fornecidas por Kabat e Mayer (1968). A quantidade de proteínas dos precipitados foi determinada pelo reativo de biureto no fotocolorímetro, Coleman Junior.

NEUTRALIZAÇÃO:

A dosagem ou titulação "in vivo" do soro anticrotálico do Instituto Butantan e do anticorpo purificado foi feita em pombos de 200 a 300 g, pelo método de Vital Brazil (1909), utilizando-se um animal por dose.

PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO:

a) Gel Filtração: Para obtenção do anticorpo específico para a crotoxina a partir do soro anticrotálico, seguiu-se o método de Chang e Yang (1969 e 1972). Utilizando-se soro crotálico e crotoxina cristalizada no ponto de equivalência pré-determinado, obteve-se o precipitado AgAc. Após lavagem do precipitado por três vezes, em soro fisiológico 0,15 M e dissolução em ácido fórmico 0,53 M - NaCl 0,15 M pH 2,05, foi o mesmo cromatografado em coluna de Sephadex G-100 (1,5 x 90) equilibrada com o tampão acima mencionado. O fluxo da coluna foi de 15 a 18 ml/hora, sendo coletados 3 ml por tubo. A absorvância dos eluatos foi medida no comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro Carl Zeiss PMQ III.

b) Cromatografia de Afinidade:

O antígeno foi ligado covalentemente à Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr), seguindo a técnica de Porath (1967). Após a lavagem de 1,0 g de Sepharose 4B (ativa

da com CNBr) em 1 mM de HCl, adicionaram-se ao gel 35 mg de de crotoxina, dissolvidas em 3,5 ml de NaHCO_3 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8,3. A mistura foi homogeneizada por duas horas. Os grupos reativos remanescentes foram bloqueados com tampão tris 0,1 M pH 8,0, sendo o excesso lavado com tampão acetato 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 4,9, seguida do tampão NaHCO_3 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 8,3. Uma coluna de 1,2 x 3 cm de altura foi equilibrada em tampão NaHCO_3 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 8,3. Após a calibração do fluxo da coluna a 6 ml/hora , foram aplicados 2 ml de soro anticrotálico.

RESULTADOS

1. OBTENÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DA CROTOXINA

a) Fracionamentos: A separação dos vários componentes da peçonha foi baseada no efeito dos sais sobre a solubilidade das proteínas. Foram empregadas duas técnicas de fracionamento pelo sulfato de amônio, descritas em Material e Métodos. As frações II e III do Método I e II' e III' do Método II, foram utilizadas como fonte de crotoxina amorfa por apresentarem, principalmente, os sistemas precipitantes da crotoxina. A análise imunoeletroforética e de dupla difusão das frações e sobrenadantes, obtidos pelos dois fracionamentos, demonstra que ambos contêm diferentes números de componentes com vários sistemas precipitantes (Figs. 4 e 5).

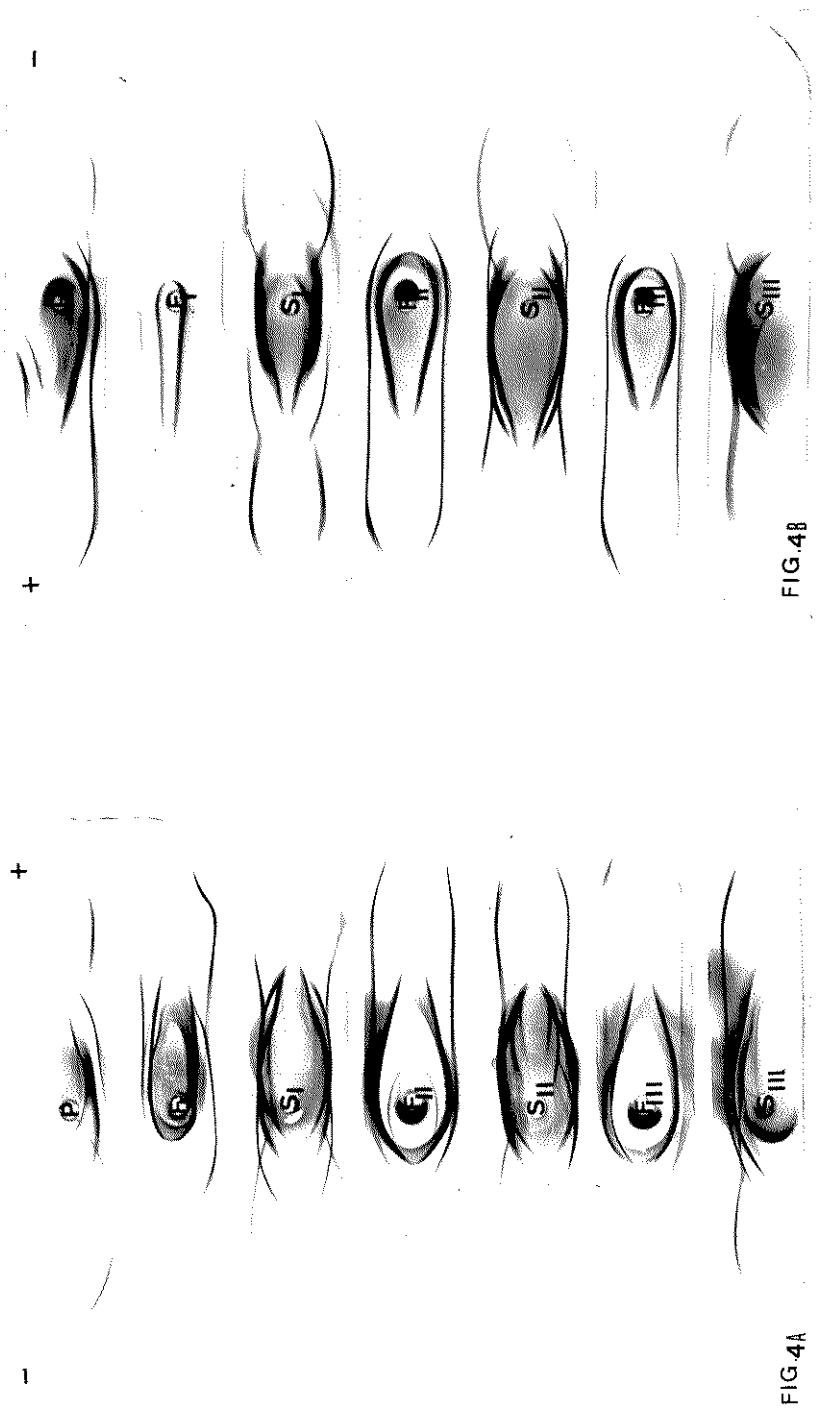


Figura 4 - Análise imunoelctroforética das frações e sobrenadantes obtidos da peçonha da cascavel sul-americana. Em A: Método I; em B: Método II. Concentração dos antígenos 10 mg/ml.

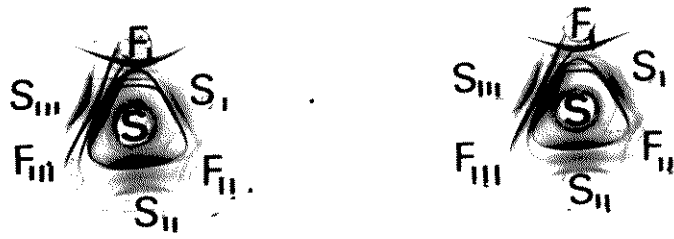


FIG.5

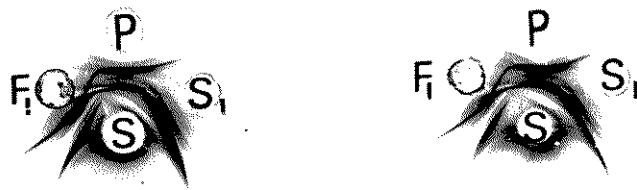


FIG.5

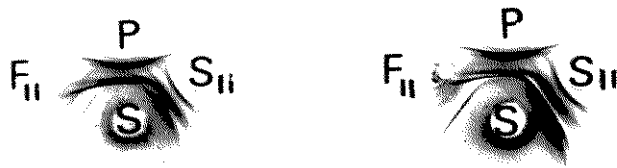


FIG.5



FIG.5

Figura 5 - Análise por imunodifusão das frações e sobrenadantes obtidos do fracionamento da peçonha da cascavel sul-americana pelo sulfato de amônio. Concentração dos antígenos 10 mg de proteína/ml.

b) Cristalização da crotoxina

amorfa: A recuperação média das cristalizações da crotoxina a partir da crotoxina amorfa (F_{II} e F_{III}) foi de 76,3% (Tabela 1).

Tabela 1

Recuperação percentual das cristalizações da crotoxina.

| Exp. | crotoxina amorfa (mg) | crotoxina cristalizada (mg) | recuperação (%) |
|-------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | 400 | 280 | 70,0 |
| 2 | 300 | 248 | 82,7 |
| 3 | 300 | 234 | 78,0 |
| 4 | 130 | 89 | 68,5 |
| 5 | 217 | 178 | 82,1 |
| média | 269,4 | 205,8 | 76,3 |

Comparando a atividade tóxica (DL50) da crotoxina amorfa e da cristalizada (Tab. 2), nota-se que o aumento havido é proporcional à redução de massa (Tab. 1). Além disso, o estreitamento dos limites da DL50 (Tab. 2), bem como os ensaios imunoeletroréticos e de dupla difusão (Figs. 6 e 7) e, mais ainda, eletroforese bidimensional (Fig. 8) da crotoxina cristalizada, permitem que,

dentro da sensibilidade dos métodos empregados, a crotoxina seja considerada em "estado de pureza". Para efeito de comparação foram realizados a imunoeletroforese, Ouchterlony e a eletroforese bidimensional da peçonha (Figs. 6, 7 e 9).

Tabela 2

Comparação entre a DL50 da crotoxina amorfa e crotoxina cristalizada.

| Exp. | crotoxina amorfa | crotoxina cristalizada |
|------|--------------------|------------------------|
| 1 | 132,8 (97,4-181,0) | 91,1 (87,5-94,7) |
| 2 | 112,5 (77,0-164,0) | 92,6 (87,6-97,7) |

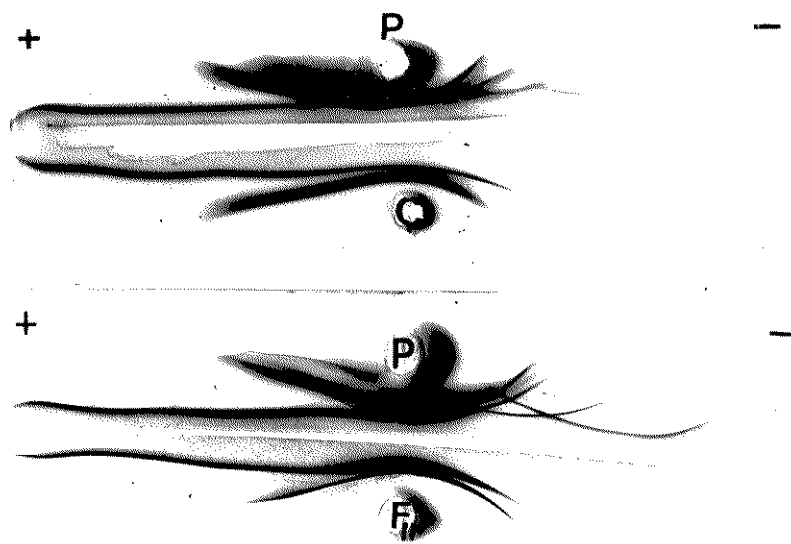


FIG 6

Figura 6 - Padrões imunoelctroforéticos da crotoxina cristalizada (C), da crotoxina amorfa (F_{II}) e da peçonha (P). Concentração proteica dos antígenos 10 mg/ml.

7

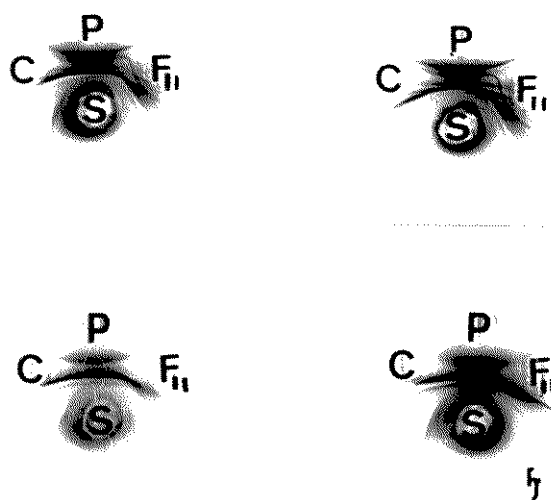


FIG. 7

Figura 7 - Análise por imunodifusão da crotoxina cristalizada (C) comparada com a crotoxina amorfa (F_{II}) e peçonha (P). Concentração proteica dos antígenos 10 mg/ml.

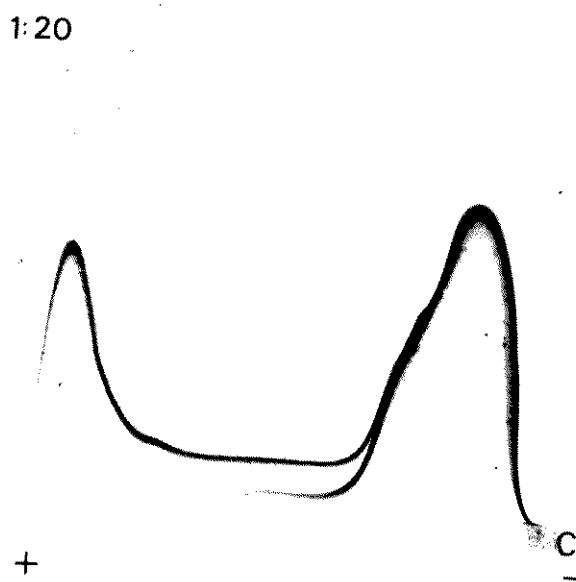


Figura 8 - Eletroforese bidimensional da crotoxina cristalizada (C). Concentração proteica do antígeno 10 mg/ml.

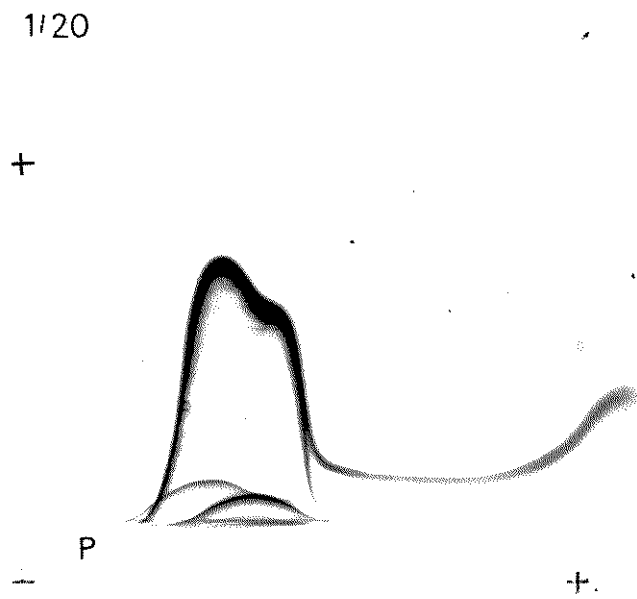


Figura 9 - Eletroforese bidimensional da peçonha da cascavel sul-americana (P). Concentração proteica do antígeno 10 mg/ml.

2. TITULAÇÃO DO ANTISSORO CROTÁLICO

O soro utilizado, ensaiado eletroforeticamente, revelou conter principalmente IgG. A figura 10 mostra a eletroforese comparativa entre o soro normal de coelho, soro comercial do Instituto Butantan e o soro utilizado na presente pesquisa.

a) Titulação "in vivo" - A titulação do antissoro crotálico foi realizada pelo processo de Vital Brazil (1903): a 1 ml de soro crotálico foram adicionadas quantidades crescentes de crotoxina e a mistura incubada a 37°C por 30 minutos foi administrada pela via venosa. Um ml de soro neutralizou, assim, 400 µg de crotoxina.

b) Titulação "in vitro" - A quantificação da precipitação específica entre a crotoxina e o soro anticrotálico está representada na Tabela 3 e Fig. 11. A imunodifusão dos sobrenadantes da reação de precipitação específica do AgAc, não delimitou a zona de equivalência, por ser o Ag (crotoxina) uma proteína heterogênea. Portanto, nesta reação, consideramos que a zona de equivalência, na qual, os reagentes em proporções ótimas se incorporam totalmente ao precipitado, está relacionada ao máximo de precipitação AgAc (Fig. 11).

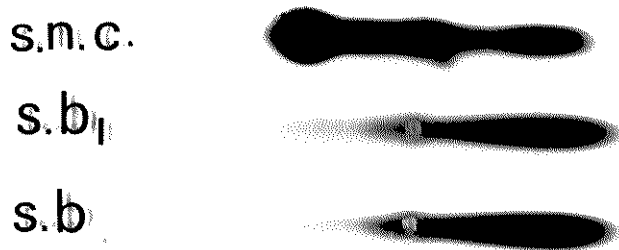


FIG. 10

Figura 10 - Eletroforese. s.n.c. - soro normal de coelho ;
s.b₁. - soro anticrotálico do Instituto Butan -
tan, utilizado para purificação do anticorpo ;
s.b. - soro comercial do Instituto Butantan.

Tabela 3

Dados quantitativos da precipitação específica no sistema crotoxina x soro anticrotálico.

| Antígeno (mg) | Precipitado AgAc (mg) | Anticorpo (mg) |
|------------------|--------------------------|-------------------|
| 0,2 | 0,264 | 0,064 |
| 0,3 | 4,84 | 4,54 |
| 0,4 | 6,3 | 5,9 |
| 0,5 | 6,5 | 6,0 |
| 0,6 | 6,1 | |
| 0,7 | 5,0 | |
| 0,8 | 4,0 | |
| 0,9 | 0,57 | |

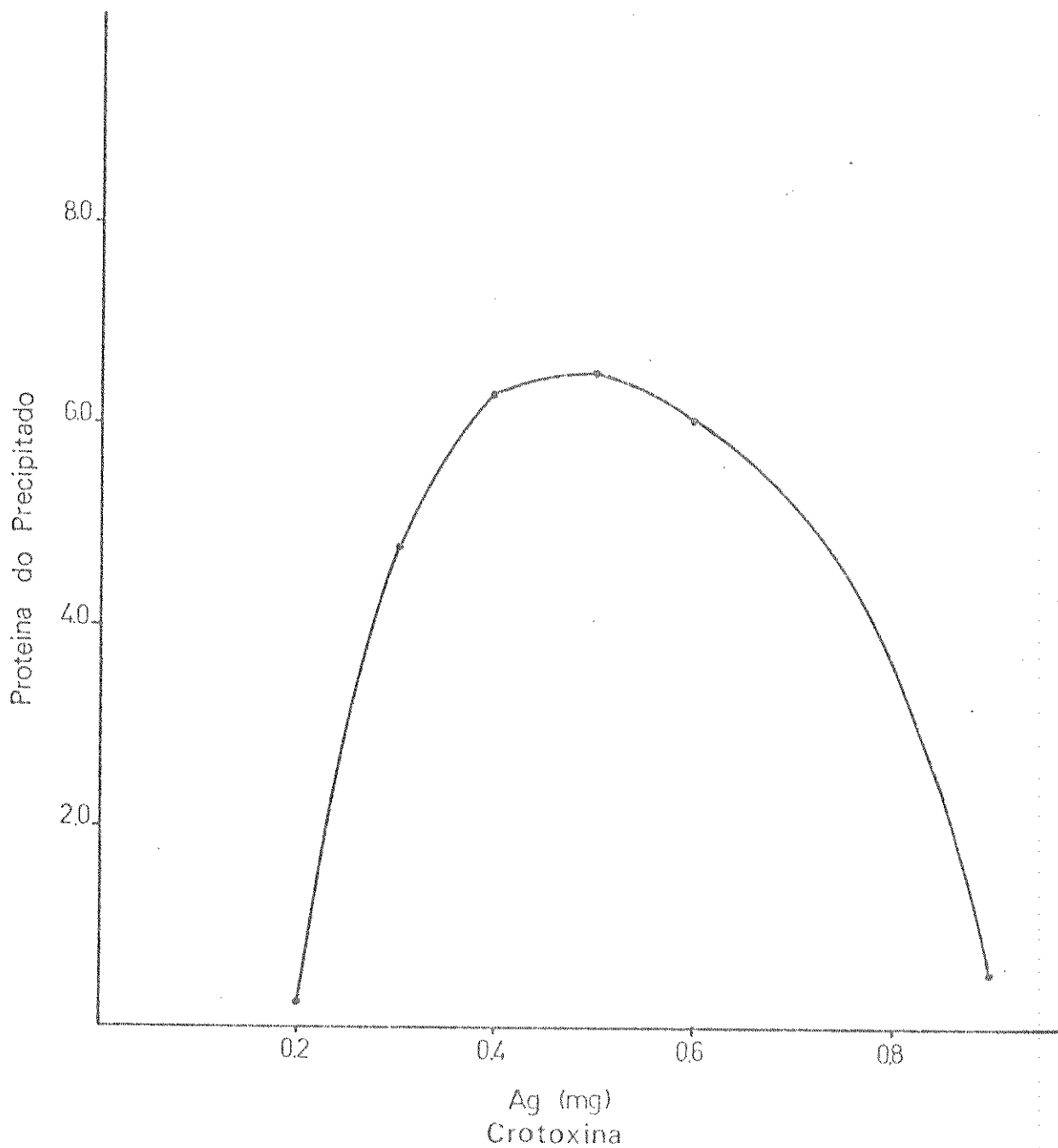


Figura 11 - Curva da precipitação específica do soro anti-crotálico pela crotoxina cristalizada.

3. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO

Determinado o ponto de equivalência, obtido pela reação da crotoxina x soro anticrotálico, pela curva de precipitação específica (Fig. 11), reagiu-se 15 mg de crotoxina com 30 ml de soro anticrotálico e obteve-se cerca de 195 mg de precipitado do complexo AgAc.

A dissociação do complexo AgAc foi iniciada pela dissolução do precipitado obtido em 6,5 ml de ácido fórmico 0,53 M - 0,15 M NaCl, seguida de cromatografia em Sephadex G-100 equilibrado no mesmo tampão em coluna K 15/90, com fluxo de 15 ml/hora, coletando-se alíquotas de 3 ml.

O perfil cromatográfico, representado na figura 12, mostra que foram eluídas três frações. As alíquotas que constituíram estas frações, foram reunidas e dialisadas em duas etapas: a inicial contra tampão tris-HCl 0,02 M pH 7,5 - 0,15 M NaCl e a última contra água desionizada.

Os testes biológicos, realizados com a primeira fração eluída, mostraram que 1 ml desta, na concentração de 6 mg/ml, era capaz de neutralizar 200 µg de crotoxina cristalizada. A capacidade neutralizante do soro anticrotálico e do anticorpo purificado está representada na Tabela 4.

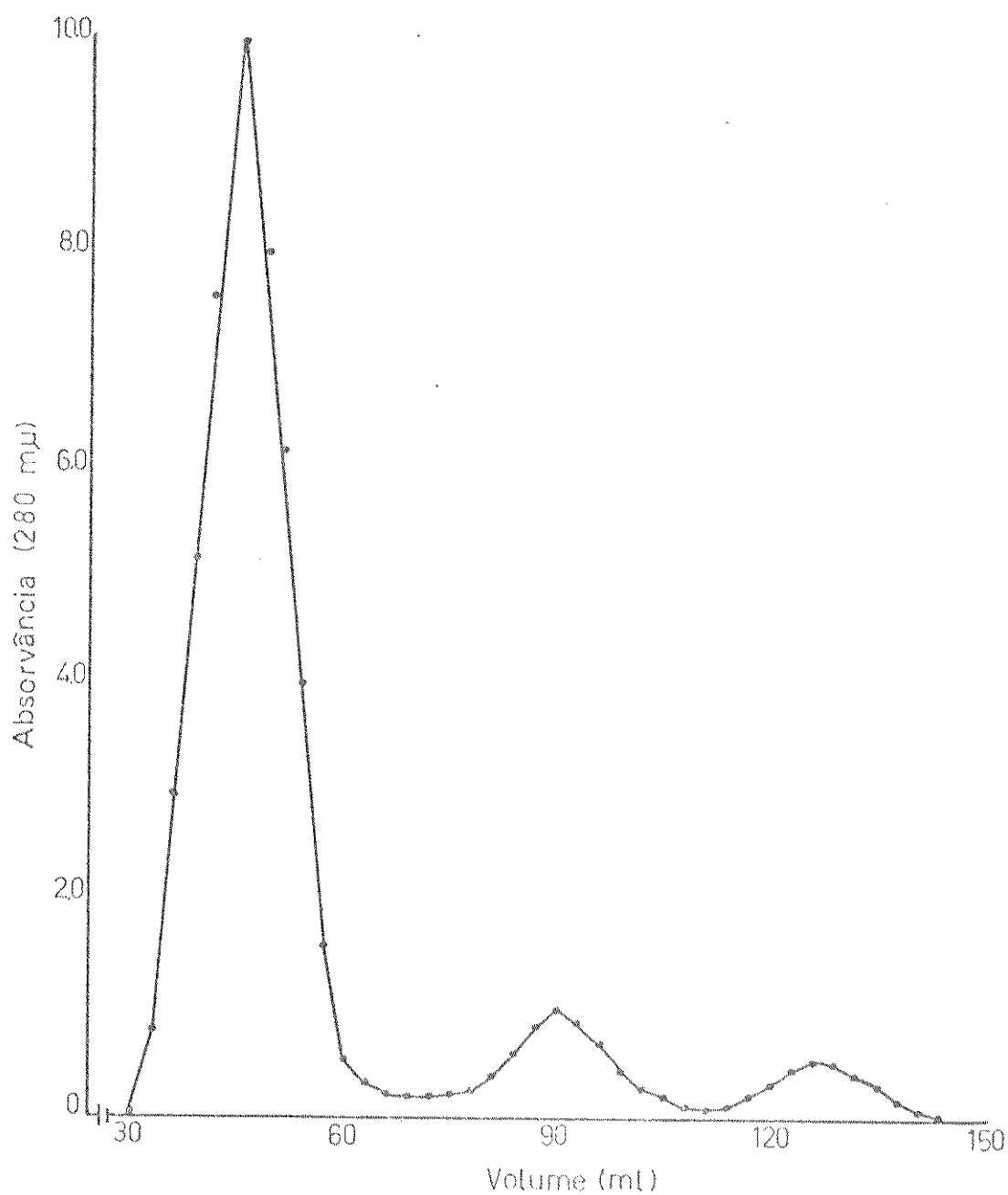


Figura 12 - Cromatografia em Sephadex G-100 do complexo cro_otoxina x soro anticrotálico. Amostra 6,5 ml = = 195 ml de proteína. Eluente: ácido fórmico 0,53 M - 0,15 M NaCl pH 2,05.

Tabela 4

Capacidade neutralizante do soro anticrotálico e anticorpo purificado numa concentração de 6 mg de proteína por ml.

| Amostras | capacidade neutralizante (μ g de crotoxina cristalizada/ mg de proteína sérica) | capacidade relativa |
|-------------------------|--|------------------------|
| soro anticrotálico | 2,5 | 1,0 |
| anticorpo purificado | 33,3 | 13,3 |

A segunda fração, quando convenientemente diluída e injetada em pombos, apresentou atividade tóxica idêntica à crotoxina cristalizada utilizada para a reação com o antissoro (Tabela 5).

A fração III não apresentou atividade tóxica nem de anticorpo quando ensaiada em pombos.

A análise imunoeletroforética da fração I, apresentada na figura 13, nos mostra que o anticorpo purificado reconhece apenas as linhas da crotoxina na peçonha. Esta mesma figura revela que o sobrenadante da reação de precipitação entre a crotoxina cristalizada x soro anticrotálico não mais reage com a crotoxina, indicando que

este sobrenadante está isento de anticorpos específicos para este antígeno.

A reação de precipitação entre a peçonha, crotoxina e o soro anticrotálico, realizada em gel de ágar, possibilitou a observação do desvio da linha de precipitação da crotoxina, pela adição do anticorpo purificado, aos poços que continham a peçonha e crotoxina (Fig. 14).

Tabela 5

Dose mínima mortal da crotoxina em pombos de 280-300 g.

| Exp. | crotoxina cristalizada (μ g) | resultado após 24 horas |
|------|--------------------------------------|----------------------------|
| | 0,4 | sobrevida |
| 1 | 0,6 | morte |
| | 0,8 | morte |
| | 0,4 | sobrevida |
| 2 | 0,6 | morte |
| | 0,8 | morte |
| 3 | 0,6* | morte |
| 4 | 0,6* | morte |

(*) Crotoxina após a dissociação do anticorpo em ácido fórmico 0,53 M - 0,15 M NaCl pH2,05 e separação em Sephadex. (fração II).

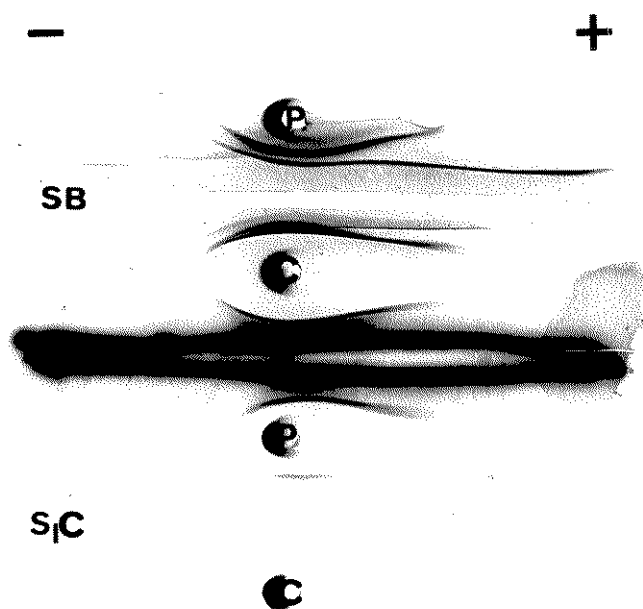


Figura 13 - Padrões imunoeletroforéticos da peçonha e da crotoxina, revelados pelos: soro anticrotálico (SB), anticorpo purificado (SP) e soro anticrotálico absorvido com crotoxina cristalizada (S₁C).

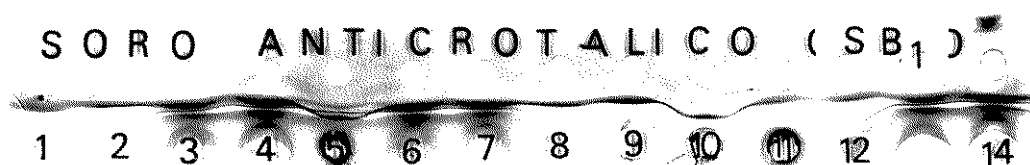


Figura 14 - Reações de precipitação em gel entre o soro anticrotálico (SB) e a crotoxina cristalizada (C), peçonha (P) e misturas desses antígenos com anticorpo purificado (A + C; A + P).

4. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO OBTIDO PELA REAÇÃO DA CROTOXINA
CRISTALIZADA MARCADA COM I¹³¹ x SORO ANTICROTÁLICO.

A crotoxina cristalizada marcada com I¹³¹ (com radioatividade inicial de 2 mCi), reagiu na equivalência com o soro anticrotálico. A marcação não interferiu na curva de precipitação da crotoxina cristalizada x soro anticrotálico. O complexo foi dissociado em ácido fórmico 0,53 M - 0,15 M NaCl pH 2,05 e cromatografado em Sephadex G-100 equilibrado no tampão mencionado acima, numa coluna K 15/70, com fluxo de 15 ml/hora. O eluato foi coletado em frações de 5 ml. Nas três experiências realizadas, os cromatogramas foram idênticos.

No perfil cromatográfico do complexo crotoxina cristalizada marcada com I¹³¹-anticrotoxina (Fig. 15), podemos verificar que foram obtidas três frações. A fração I, quando ensaiada "in vivo" e "in vitro", mostrou ser o anticorpo; a fração II, por apresentar maior concentração de radioatividade, é a crotoxina e a fração III, provavelmente, uma desnaturação do anticorpo, por não apresentar radioatividade nem atividade de anticorpo.

Para a leitura da radioatividade utilizou-se calibrador de dose Mediac mais adequado para valores elevados do que o contador gama de poço de cristal de iodeto de sódio (Tl).

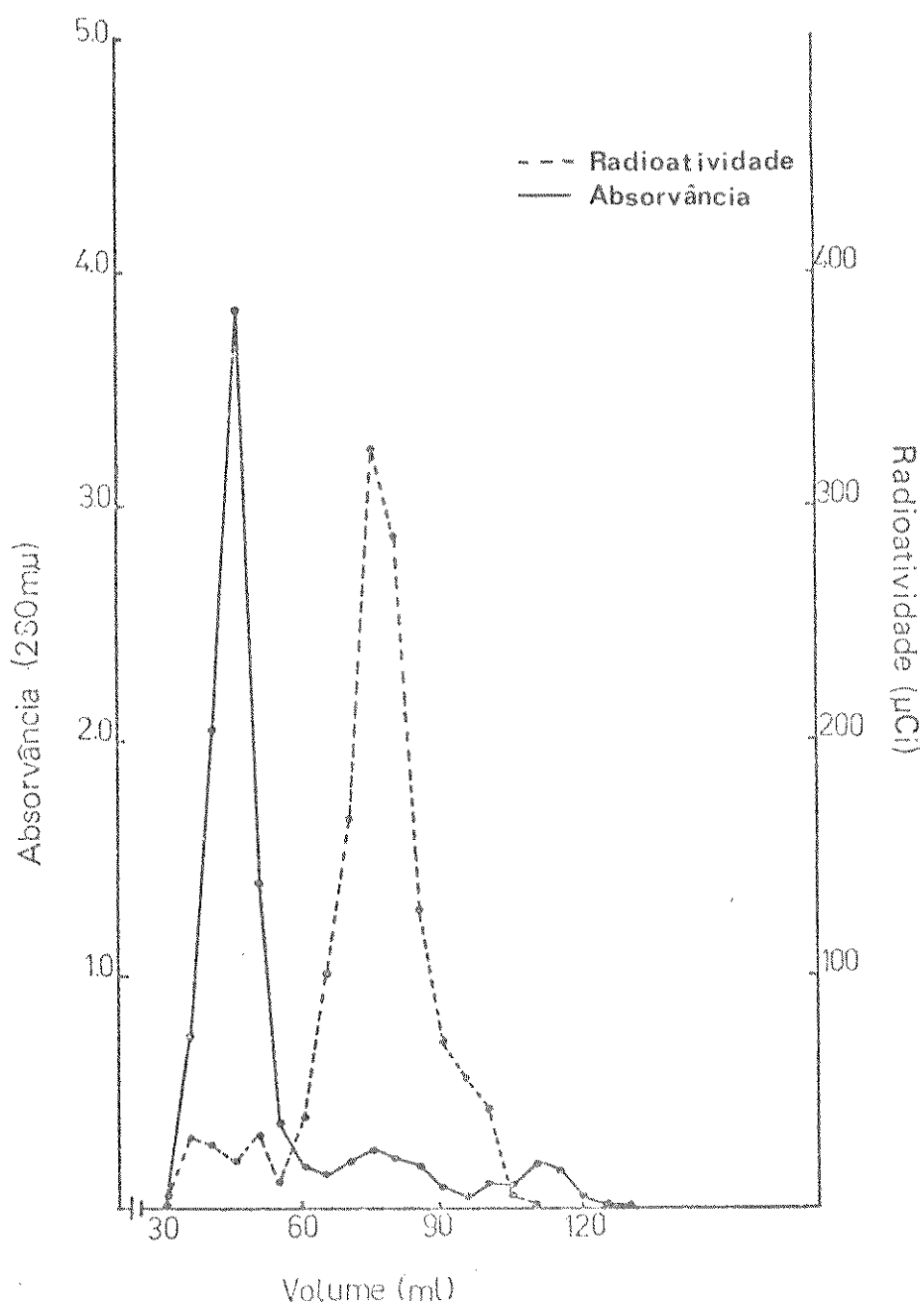


Figura 15 - Cromatografia em Sephadex G-100 da separação do anticorpo específico para a crotoxina cristalizada da crotoxina marcada com I^{131} em uma coluna K 15/70. Eluente: ácido fórmico 0,53 M - 0,15M NaCl pH 2,05.

5. PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ESPECÍFICO PARA A CROTOXINA POR AFINIDADE CROMATOGRÁFICA.

Aliquotas de 2 ml de soro anti-crotálico foram cromatografadas numa coluna (1,2 x 3) de Sepharose 4B CNBr ligada covalentemente à crotovina cristalizada, equilibrada com tampão NaHCO_3 0,1 M - 0,5 M NaCl pH 8,3. O material absorvido foi eluído com tampão acetato 0,1 M - 0,5 M NaCl pH 4. Foram realizadas seis experiências.

O perfil cromatográfico está representado na figura 16. As frações foram reunidas e dialisadas em tampão tris-HCl 0,02 M pH 7,5 NaCl 0,15 M e água desionizada e a seguir, liofilizadas.

A fração II foi dissolvida em 6 ml de PBS (tampão fosfato salina) 0,15 M pH 7,3, sendo a porção insolúvel, separada por centrifugação a 5000 r.p.m. por 20 minutos. A porção solúvel foi cromatografada em Sephadex G-200 equilibrado em PBS 0,15 M pH 7,3 numa coluna K 15/87, com fluxo de 10 ml/hora. O eluato foi coletado em volumes de 3 ml. O perfil cromatográfico está representado na figura 17. A primeira e a terceira frações, quando ensaiadas, não apresentaram atividade de anticorpo. A segunda fração, quando ensaiada, revelou o seguinte poder de neutralização: 1 ml do anticorpo, com uma concentração de 0,6 mg/ml, neutralizou 20 μg de crotovina cristalizada.

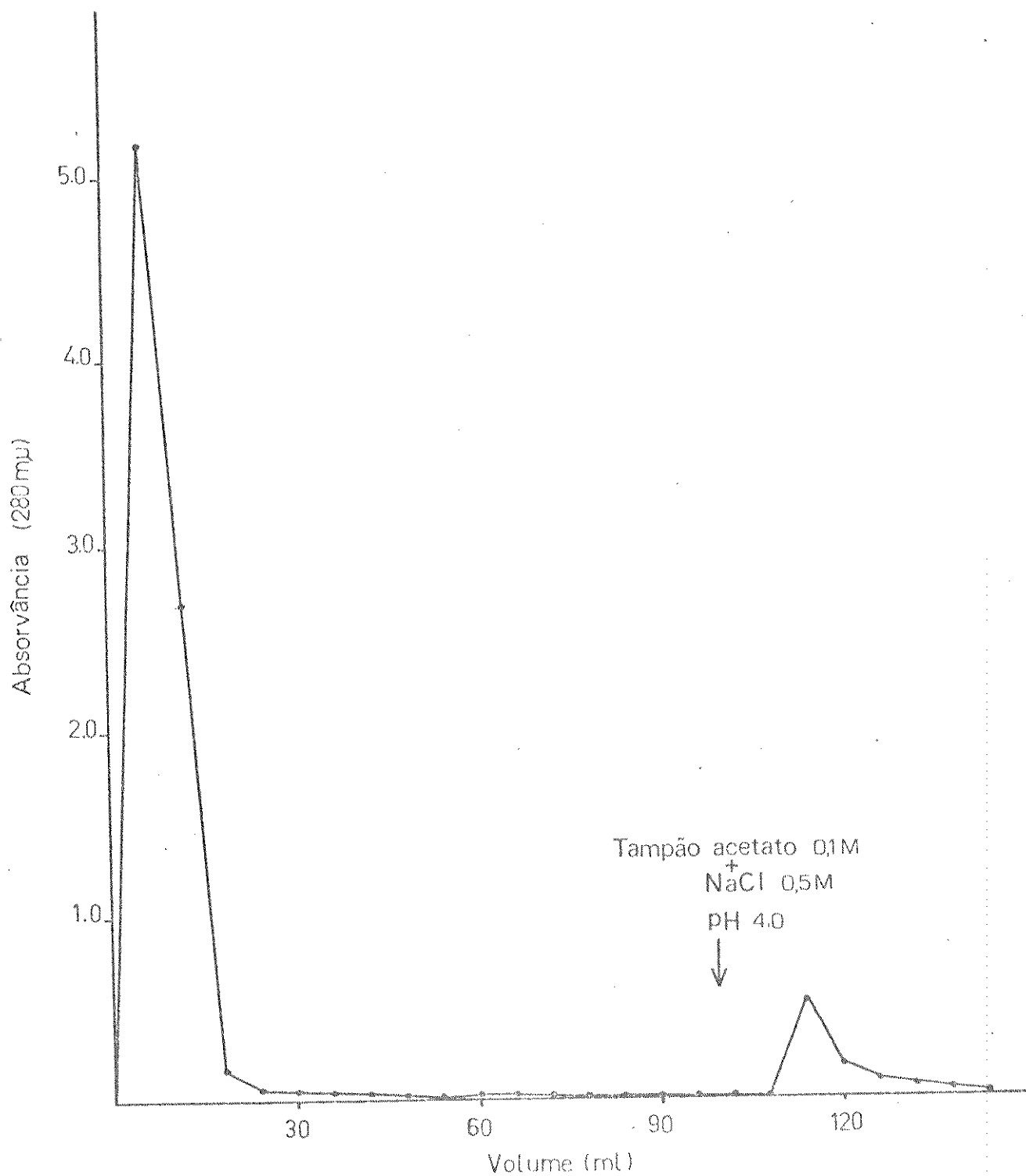


Figura 16 - Perfil cromatográfico da purificação do anticorpo específico para a crotoxina, por cromatografia de afinidade em Sepharose 4B ativada com CNBr.

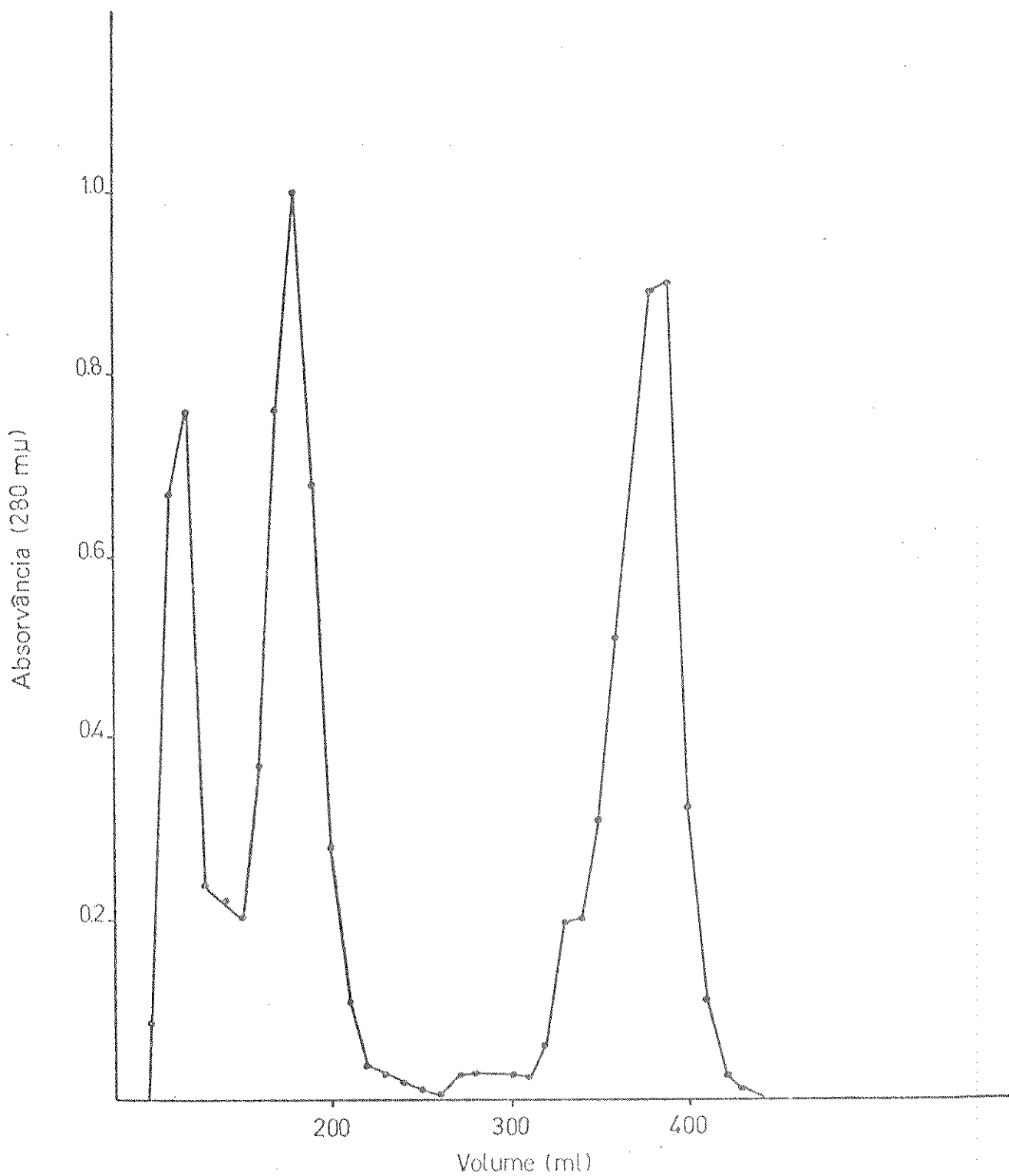


Figura 17 - Cromatografia em Sephadex G-200, equilibrado em tampão PBS 0,15 M pH 7,3, do anticorpo purificado. Fluxo da coluna 10 ml/hora.

O estudo comparativo entre a capacidade neutralizante do soro anticrotálico e do anticorpo purificado está na Tabela 6.

Tabela 6

Capacidade neutralizante do soro anticrotálico e anticorpo purificado por cromatografia de afinidade numa concentração de 0,6 mg de proteína por ml.

| Amostras | capacidade neutralizante (μ g de crotoxina cristalizada/ mg de proteína sérica) | capacidade relativa |
|-------------------------|--|------------------------|
| soro anticrotálico | 2,5 | 1,0 |
| anticorpo purificado | 33,3 | 13,3 |

Os ensaios imunoeletroforéticos, da fração II da figura 17, estão representados na figura 18.

A imunodifusão da mesma fração está na figura 19.

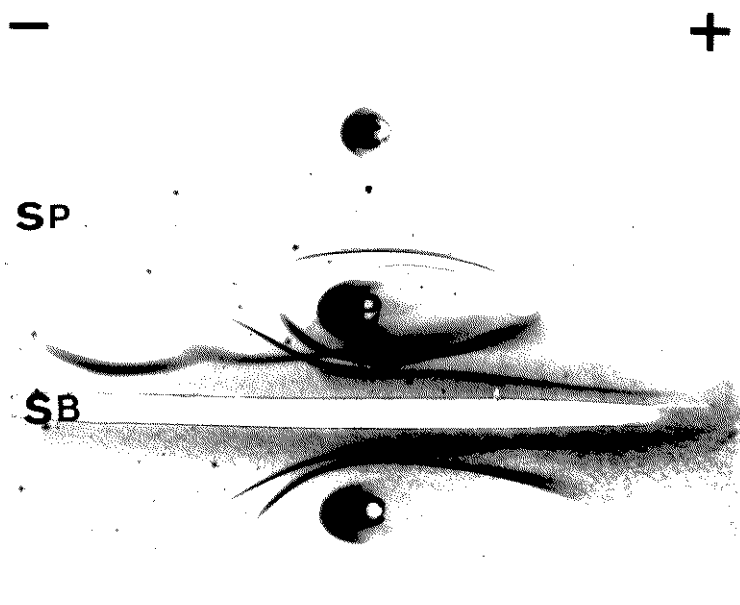


Figura 18 - Padrões imunoelectroforéticos da peçonha e da crotoxina, revelados pelos: soro anticrotálico (SB), anticorpo purificado por imunoadsorvente (SP).



Figura 19 - Reações de precipitação em gel entre o anticorpo purificado (SP), a crotoxina cristalizada (C) e a peçonha (P). Concentração de C e P 50 µg, de SB 800 µg e de SP 30 µg.

DISCUSSÃO

Na obtenção de anticorpos, numerosos métodos imuno-específicos têm sido relatados, nenhum porém foi tão satisfatório quanto o de Chang e Yang (1969 e 1972), que purificaram o anticorpo específico para a cobrotoxina por gel filtração, numa coluna de Sephadex, após a dissolução do precipitado AgAc específico em ácido fórmico. O antígeno utilizado, a cobrotoxina, é o principal componente da peçonha da Naja naja atra de Formosa. Apresenta baixo peso molecular, é homogênea e imunogênica.

A crotoxina é também uma proteína de baixo peso molecular (Gralén e Svedberg, 1938), 30.000, imunogênica, embora não seja homogênea (Rübsamen, 1971a, b; Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971), mas sim um complexo consistindo principalmente de duas proteínas com cargas diferentes unidas por interações ácido-básicas: a fosfolipase A e a crotapotina.

Segundo Breithaupt et al., 1974, a crotoxina apresenta pI de 4,7, enquanto o seu componente básico - fosfolipase A - e sua proteína ácida - crotapotina - apresentam, respectivamente, pontos isoelétricos de 9,7 e 3,4. Esses valores estão próximos aos observados por Horst et al., que em 1971, encontraram o pI de 8,6 para a fosfolipase A e 3,7 para a crotapotina.

Sabendo-se que, quando o pH de uma solução está acima do pI de uma proteína esta terá uma carga negativa livre e se moverá para o ânodo, podemos interpretar a Fig. 6 (pág. 24), que revela para a crotoxina a presença de dois sistemas precipitantes. O componente que migra rapidamente para o ânodo, em função de seu pI bem menor do que 8,6, é a crotapotina, o outro, de migração lenta, devida à proximidade entre seu pI e o pH do tampão, é a fosfolipase.

Em eletroforese bidimensional da crotoxina e da peçonha Figs. 8 e 9 (págs. 26 e 27), podemos observar que a força eletrostática existente entre os dois componentes é grande, pois na eletroforese eles não se dissociam completamente. O "ombro" que pode ser visto na Fig. 8 (pág. 26), deve ser interpretado como uma associação de crotapotina e fosfolipase A, na crotoxina. Na peçonha, Fig. 9 (pág. 27), esta associação, sendo bem maior, poderia traduzir uma facilidade de combinação da crotapotina, através de suas cadeias polipeptídicas, com outros componentes além da fosfolipase, razão pela qual a proporção de crotapotina, dissociada na eletroforese da peçonha, é bem menor do que aquela que se observa na eletroforese da crotoxina.

Os estudos farmacológicos já rea

lizados mostram que a fosfolipase A, embora tóxica, é aproximadamente 8 vezes menos tóxica do que a crotoxina. Quanto à crotapotina, é praticamente atóxica. A associação de 2/1 (Rübsamen, 1971) entre a fosfolipase A e a crotapotina é necessária para restituir a toxicidade do complexo. No envenenamento ofídico, a "causa mortis" - paragem respiratória ou nefrotoxicidade - é atribuída à crotoxina e não a cada um de seus componentes isolados. Essas considerações apontam a obtenção do anticorpo específico para a crotoxina como etapa inicial e necessária para o estudo da participação da crotoxina, bem como das demais toxinas da peçonha da cascavel sul-americana, na fisiopatologia do envenenamento crotálico.

Quando comparamos a capacidade neutralizante do antissoro crotálico com a do anticorpo purificado, verificamos que o último demonstrou ter uma capacidade neutralizante 13 vezes maior do que o antissoro inicial (soro anticrotálico). Tabela 4 (pág. 34).

Utilizando a técnica de dosagem "in vitro", Chang e Yang encontraram para o anticorpo específico para a cobrotoxina, uma capacidade neutralizante 17,5 vezes maior do que o antissoro por eles utilizado. Os autores referidos trabalharam com soro total de coelho, do qual isolaram a IgG numa etapa intermediária. Conforme pode ser verificado na Fig. 10 (pág. 29), o soro anticrotálico por nós utilizado já se encontrava nesta etapa de purificação.

Além disso, Chang e Yang não referem a neutralização "in vivo".

A homogeneidade do anticorpo purificado ficou demonstrada através de técnicas de imunodifusão por absorção e imunoeletroforese. Como pode ser observado na Fig. 13 (pág. 36), a reação entre a peçonha e o soro anticrotálico (parte superior da figura) revela 5 a 6 sistemas precipitantes, incluindo o sistema crotoxina. Já as reações entre a peçonha e o anticorpo (porção média da figura) e entre a peçonha e o sobrenadante da precipitação AgAc (isento de anticorpo específico para a crotoxina), parte inferior da figura, são complementares. Na reação entre a peçonha e o anticorpo purificado temos as linhas que correspondem à crotoxina, enquanto que na reação entre a peçonha e soro desprovido de anticorpo específico para a crotoxina temos as demais linhas, estando ausente o sistema crotoxina. Na imunodifusão da peçonha e crotoxina absorvida pelo anticorpo purificado, a linha de precipitação da crotoxina sofreu um nítido desvio, Fig. 14 (pág. 36). A dissociação do complexo antígeno-anticorpo, apesar da utilização de ácido fórmico em alta molaridade, não afetou as propriedades tóxicas da crotoxina. O pico II que se observa na Fig. 12 (pág. 33), quando ensaiado "in vivo", mostrou ter conservado sua toxicidade (Tabela 5, pág. 35).

A purificação do anticorpo específico para a crotoxina foi acompanhada também pela marcação da crotoxina com I^{131} . Por este processo ficou evidente que houve uma boa dissociação do precipitado AgAc pela presença de 93% de radioatividade no pico referente à crotoxina (segundo pico), Fig. 15 (pág. 38).

Segundo Di Sabato (1965), o marcador radioativo pode reagir com grupos ativos de moléculas proteicas e, então, causar inativação das mesmas. Na opinião de Habermann (1972), os agentes oxidantes necessários para o procedimento da marcação podem atacar as cadeias laterais das proteínas que contêm pontes de dissulfeto e inativá-las. Entretanto, Gomes Lomba, em 1969, verificou que o método de Greenwood para a marcação da crotoxina com I^{131} não interferia no comportamento farmacológico e imunológico desta toxina, razão pela qual o processo foi selecionado. A marcação com I^{131} possibilitou ainda a caracterização do terceiro pico, Fig. 15 (pág. 38). A ausência de toxicidade, de atividade de anticorpo e de radioatividade, levou-nos a concluir que este pico deveria ser resultado da desnaturação do anticorpo pelo ácido fórmico.

O anticorpo purificado por cromatografia de afinidade específica, quando testado "in vivo", apresentou a mesma capacidade neutralizante do anticorpo purificado pelo método descrito acima. A imunodifusão, Fig. 19

(pág. 43), nos mostra que o anticorpo purificado, frente à peçonha e à crotoxina, apresenta os dois sistemas precipitantes (fosfolipase A e crotapotina). A imunoeletroforese, Fig. 18 (pág. 43), revelou que o anticorpo reage melhor com a peçonha, apresentando pelo menos três sistemas precipitantes. Este terceiro sistema, que pode ser relativo a associação da fosfolipase e crotapotina, não foi revelado pelo outro método por não termos separado os complexos solúveis, os quais, possivelmente, impediram a precipitação das moléculas associadas.

CONCLUSÕES

1. O anticorpo específico para a crotoxina pôde ser purificado a partir do soro anticrotálico por dois métodos:

a) por precipitação do Ag*/Ac** no ponto de equivalência seguida da dissociação do precipitado e separação do Ag*/Ac** por cromatografia de exclusão em Sephadex G-100 com recuperação do antígeno;

b) por afinidade cromatográfica.

2. A imunodifusão e a imunoelectroforese revelaram que o anticorpo específico para a crotoxina reage com ambos os componentes do complexo crotoxínico, fosfolipase A e a crotapotina.

3. A capacidade neutralizante do anticorpo específico para a crotoxina é 13 vezes maior que a do soro do qual foi obtido.

* antígeno - crotoxina

** anticorpo - anticorpo específico para a crotoxina.

RESUMO

A peçonha da cascavel sul-americana, submetida à precipitação fracionada pelo sulfato de amônio, foi separada em vários componentes (F_I , F_{II} , F_{III} e S_I , S_{II} , S_{III}).

As frações F_{II} , F_{III} e $F_{II'}$, $F_{III'}$, representando cerca de 50% do rendimento da precipitação, são constituídas principalmente de crotoxina amorfa que foi cristalizada.

À imunoeletroforese e imunodifusão, a crotoxina cristalizada revelou dois sistemas precipitantes: fosfolipase A e crotapotina.

Tanto a crotoxina assim obtida, como a marcada com I^{131} , foram utilizadas como antígeno.

A purificação do anticorpo específico para a crotoxina foi obtida por dois métodos:

1. o antígeno reagiu com o soro anticrotálico no ponto de equivalência e o precipitado AgAc foi dissociado em ácido fórmico e cromatografado em Sephadex G-100;

2. o antígeno insolúvel, covalentemente ligado a uma matriz, Sepharose 4B ativada com CNBr, foi purificado por afinidade cromatográfica.

O anticorpo, obtido pelos dois processos mencionados acima, foi ensaiado por imunoeletroforese e imunodifusão.

A capacidade neutralizante específica deste anticorpo foi 13 vêzes maior do que a do soro anticrotálico, quando testado em pombos.

BIBLIOGRAFIA

- ARTHUS, M. - De la spécificité des sérums antivenimeux - sérum anticobraïque, antibothropique et anticrotalique. *Venins de Lachesis lanceolatus, de Crotalus terrificus et de Crotalus adamanteus. Arch. int. Physiol. Liège, 12: 317, 1912.*
- AXEN, R., PORATH, J. and ERNBACK, S. - Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of Cyanogen halides. *Nature, 214: 1302, 1967.*
- BRAZIL, V. e PESTANA, B.R. - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. méd. S. Paulo, 12: 415, 1901.*
- BRAZIL, V. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico. *Rev. méd. S. Paulo, 6: 265, 1903.*
- BRAZIL, V. - Dosagem do valor anti-tóxico dos serums antipeçonhentos. *Rev. méd. S. Paulo, 22: 119, 1909.*
- BREITHAUPT, H., RÜBSAMEN, K., WALSCH, P. and HABERMANN, E. - *In vitro* and *in vivo* interactions between phospholipase A

and a novel potentiator isolated from so called crotoxin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak., 269: 403, 1971.

BREITHAUPT, H., RÜBSAMEN, K. and HABERMANN, E. - Biochemis-
try and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical
analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospho-
lipase A. *Eur. J. Biochem.*, 49: 333, 1974.

CALMETTE, A. - Contribution a l'etude du venin des serpents.
Immunisation. *Annls Inst. Pasteur*, p 284, 1894.

CHANG, C.C. and YANG, C.C. - Immunochemical studies on cobro-
toxin. *J. Immun.*, 102(6): 1437, 1969.

CLARKE, H.G.M. - Two-dimensional (Laurell) immunoelectro-
phoreses for estimation of antigen in relative units. In:
WILLIAMS, C.A. and CHASE, M.W., ed. *Methods in immunology
and immunochemistry*. London, Academic Press. 1971. v. III,

CUATRECASAS, P. - Protein purification by affinity chromato-
graphy. *J. biol. Chem.*, 245: 3059, 1970.

CUATRECASAS, P. and ANFINSEN, C.B. - Affinity chromatography.
In: COLLOWICK, P.S. and KAPLAN, N.O. *Methods in Enzymology*.

New York, Academic Press, 1971a. v.22, p. 345.

CUATRECASAS, P. and ANFINSEN, C.B. - Affinity chromatography.

A. Rev. Biochem., 40: 259, 1971b.

FLODIN, P. - *Dextran gels and their applications in gel filtration*. Sweden, Upsala, 1962. 85 p.

FRAENKEL-CONRAT, H. and SINGER, B. - Fractionation and composition of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 60: 64, 1956.

FRAENKEL-CONRAT, H. and SINGER, B. - Recent chemical studies on crotoxin. In: BUCKLEY, E.E. and PORGES, N., ed. *Venoms*. Washington, D.C., 1965. p. 259.

GOMES LOMBA, M. - *Estudos sobre a distribuição e excreção da crotoxina I^{131} em cães*. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Central de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1969.

GOMORI, G. - Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O., ed. *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1965.

GRABAR, P. and BURTIN, P. - *Immunoelktrophoretische analyse*.
New York, Elsevier Publ. Co., 1964.

GRABAR, P. and WILLIAMS, C.A. - Méthode permettant l'étude
conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunoche-
miques d'un mélange de protéines. Application au sérum
sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 10: 193, 1953.

GRALÉN, N. and SVEDBERG, T. - The molecular weight of the
crotoxin. *Biochem. J.*, 32: 1375, 1938.

GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. and GLOVER, J.S. - The
preparation of I¹³¹ labelled human growth hormone of high
specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89: 114, 1963.

GUYDA, H. and FRIESEN, H.G. - The separation of monkey
prolactin from monkey growth hormone by affinity chroma-
tography. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 42: 1068, 1971.

HABERMANN, E. - Gewinnung und Eigenschaften von Crotactin ,
Phospholipase A, Crotamin und Toxin III aus dem Gift der
Brasilianischen Klapperschlange. *Biochem. Z.*, 329: 405,
1957.

HABERMANN, E. - Biochemie, Pharmakologie und Toxicologie

der Inhaltstoffe von Hymenopteren giften. *Rev. physiol. Biochem. exp. Pharmacol.*, 60: 220, 1968.

HABERMANN, E. and RÜBSAMEN, K. - Biochemical and pharmacological analysis of the so called crotoxin. In: de VRIES, KOCHVA, ed. *Toxins of Animal and Plant Origin*. London, Gordon and Breach. 1971. v. 1, p. 333.

HABERMANN, E., WALSCH, P. and BREITHAUPT, H. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. II. Possible interrelationships of phospholipase, crotoxin and their combination. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 273: 313, 1972.

HEIDELBERGER, M. and KENDAL, F.E. - The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and the homologous antibody. II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. *J. exp. Med.*, 61: 559, 1935.

HENDON, R.A., ROY, D. and FRAENKEL-CONRAT, H. - Can rattlesnake neurotoxin and phospholipase be separated? *Toxicon*, 8: 135, 1970.

HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological roles of

the two components of crotoxin. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 68 (7): 1560, 1971.

HORST, J., HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. - The active components of crotoxin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 46(3): 1042, 1972.

HWANG, P., MURRAY, J.B., JACOBS, J.W., NIALL, H. D. and FRIESEN, H. - Human amniotic fluid prolactin. Purification by affinity. Chromatography and amino-terminal sequence. *Biochemistry*, 13(II): 2354, 1974.

KABAT, E.A. and MAYER, M.M. - *Experimental Immunochemistry*. 1st ed. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas Publ. 1968.

LAMB, G. and HANNA, W. - Specificity of antivenous sera. *Scient. Mem. Offis med Sanit. Deps India*, 5: 1, 1903.

LAMB, G. and HANNA, W. - Specificity of antivenous sera. *Scient. Mem. Offis med Sanit. Deps India*, 10: 1, 1904.

LI, C.H. and FRAENKEL-CONRAT, H. - Electrophoresis of crotoxin. *J. Amer. chem. Soc.*, 64: 1586, 1942.

NEUMANN, W.P. and HABERMANN, E. - Über crotactin, das Haupttoxin des Giftes der Brasilianischen Klapperschlange (*Crotalus durissus terrificus*). *Biochem. Z.*, 327: 170, 1955.

OUCHTERLONY, O. - Immunodifusion and immunoelectrophoresis.

In: WEIR, D.M., ed. *Handbook of experimental immunological*. Oxford, Blackwell. 1967. p. 665.

PHYSALIX, C. and BERTRAND, G. - Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de Vipère.

Compt rendu de la Soc. de Biol., Paris, Séries X, Tome 1: 111, 1894.

PORATH, J., AXEN, R. and ERNBACK, S. - Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*, 215: 1491, 1967.

RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H. and HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex.

Naunyn-Achmiedebergs Arch. Pharmak., 270: 274, 1971.

SABATO, D. di - The role of the tyrosyl groups on the mechanism of action of chicken heart lactic dehydrogenase.

Biochemistry, 4: 2288, 1965.

SEWEL, H. apud TIDSWELL, Fr. - *Researches on Australian venoms snake bite, snake venom and ativenin. Researches on Australian venoms*. New South Wales, Sidney, Department of Public Health, W.A. Glick, 1906. p. 79.

SLOTTA, K. and FRAENKEL-CONRAT, H. - Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, 12: 505, 1938.

TIDSWELL, Fr. - *Researches on Australian venoms snake bite, snake venom and antivenin. Researches on Australian venoms.* New South Wales, Sidney, Department of Public Health, W. A. Glick, 1906. p. 79.

VITAL BRAZIL, O., PRADO-FRANCESCHI, J. and WAISBICH, E. - Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 973, 1966a.

VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 981, 1966.

VITAL BRAZIL, O., FARIÑA, R., YOSHIDA, L. and OLIVEIRA, V.A. Pharmacology of crystalline crotoxin. III. Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus terrificus* venom. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 992, 1966b.

VITAL BRAZIL, O. and HADLER, W.A. - Pharmacology of crys-

talline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. *Mem. Inst. Butan - tan, Simp. Internac.*, 33(3): 1001, 1966.

VITAL BRAZIL, O. - Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. *J. Formosan med Ass.*, 71(6): 394, 1972.

VITAL BRAZIL, O., EUGÊNIO, A.G. and LAZSLO, G.M. - Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciência e Cultura*, 25(12): 1165, 1973.

VITAL BRAZIL, O. and EXCELL, B.J. - Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 212: 34, 1971.

WEISCHSELBAUM. T.E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Am. J. clin. Path. tech. Suppl.*, 10: 40, 1946.

WEILL, C.S. - Tables for convenient calculation of median effective dose (LD50 or ED50) and instruction in their use. *Biometrics*, 8: 249, 1952.

YANG, C.C. - Immunochemical studies on cobrotoxin. *J. Formosan med Ass.*, 71: 372, 1972.