



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**INFLUÊNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS
FORMADAS DURANTE O PROCESSO DE DESTOXICAÇÃO
DE TOXINAS POR RADIAÇÃO IONIZANTE**

MURILO CASARE DA SILVA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento**

**São Paulo
2003**

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

**INFLUÊNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS FORMADAS
DURANTE O PROCESSO DE DESTOXICAÇÃO DE TOXINAS POR
RADIAÇÃO IONIZANTE**

MURILO CASARE DA SILVA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Dra.: Nanci do Nascimento

SÃO PAULO

2003

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por renovar as minhas forças a cada momento em que ela me faltava e por sempre me abençoar.

Aos meus pais Carmelino e Antonia, que me são o meu "alicerce", por tudo que eles me fizeram, pela total confiança e total incentivo.

Aos meus irmãos Vitor e Danieli por todo apoio e por tantas vezes me ajudarem.

Ao meu sobrinho Matheus que certamente serve de incentivo para cada vez mais seguir em frente.

Ao meu tio Antonio, tia Cleusa e meus primos Fabio e Silvia, por todo apoio e por serem muitas vezes a minha segunda família.

Ao meu tio Marcel e a minha tia Adelina e aos meus primos Marcel e Laura, por sempre estarem de portas abertas para me receber sempre que necessitei ficar em São Paulo.

Ao Doutor Roberto Fulfaro e à Doutora Mitiko Saiki, os primeiros a me darem oportunidade de ingressar neste Instituto.

Ao Doutor Daniel Pimenta, do Instituto Butantã, por ter me ajudado com as análises de espectrometria de massa.

À Doutora Fernanda Portaro do Instituto Butantã, por ter me ajudado com as análises de Fluorescência.

Ao Doutor Heitor do Instituto de Medicina Tropical, por sempre estar de portas abertas para nos receber.

Aos amigos Andrés, André Tempone, Daniel Perez, Luciana e Roberto, do Instituto de Medicina Tropical que tanto me ajudaram.

Aos meus amigos, Alberto, Janaina, Leonardo e Lucélia do Grupo de Venenos do IPEN por terem me aturado durante esse tempo.

Aos funcionários do departamento que por tantas vezes limpam a minha "bagunça".

À todos os Doutores do Departamento que de alguma forma colaboraram para esse trabalho.

Ao Senhor Doutor Patrick que se não foi um Pai, foi pelo menos um irmão mais velho durante esse tempo e por tantas vezes colaborar com meu trabalho, por toda dedicação e sabedoria que me transmitiu.

À minha Orientadora Doutora Nanci por todo respaldo, confiança e total liberdade para desenvolver o meu trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Dedico este trabalho ao meu Avô **Anísio Rodrigues da Silva** "*in memoriam*" que foi e continua sendo o meu exemplo de Honestidade, Humildade e Serenidade; de onde estiver, estará sempre, Aqui, dentro do meu coração e caminhando ao meu lado me dando força e renovando as minhas esperanças.

INFLUÊNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS FORMADAS DURANTE O PROCESSO DE DESTOXICAÇÃO DE TOXINAS POR RADIAÇÃO IONIZANTE

MURILO CASARE DA SILVA

RESUMO

A radiação ionizante vem sendo empregada com sucesso na destoxicação de venenos. Neste trabalho a radiação foi utilizada para verificar os efeitos causados pelos produtos de radiólise da água em duas toxinas (Crotoxina e Crotamina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Estes efeitos foram analisados com o uso de algumas substâncias denominadas "scavengers", que competem por espécies reativas específicas impedindo-as de agir na molécula.

Para estudar, então, os possíveis danos estruturais causados às toxinas foram utilizadas as técnicas de absorção ultravioleta, fluorescência, espectrometria de massa, atividade enzimática, além de técnicas bioquímicas para avaliar a perda da toxicidade e a capacidade de produção de anticorpos antes e após a irradiação das toxinas.

Os resultados obtidos indicaram que a radiação ionizante causa danos estruturais mesmo em baixas doses de radiação, essas alterações produzem diminuição da toxicidade porém mantém as propriedades imunogênicas das toxinas.

**INFLUENCE OF THE MAIN REACTIVE SPECIES FORMED DURING
THE DETOXICATION PROCESS OF TOXINS BY IONIZING
RADIATION**

MURILO CASARE DA SILVA

ABSTRACT

Ionizing radiation has been satisfactorily employed for venoms detoxification. In this report, the radiation was employed to verify the effects caused by the radiolysis products of water on two toxins (Crotoxin and Crotamine) purified from *Crotalus durissus terrificus* venom.

These effects were analyzed using some substances called "scavengers", those substances competes for specific reactive species hindering them to act on the toxins molecules.

In order to study the possible structural damages caused on the toxins, uv spectra, fluorecence, mass spectrometry, enzymatic activity were employed. In addition, biochemical techniques were employed to evaluate the decrease of toxicity and the immunogenicity of toxins before and after the irradiation.

Our results indicate that the irradiation promotes structural damages, even at low doses. These modifications lead to a gradual decrease in toxicity, however, the immunogenic properties of the toxins are preserved

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Venenos	1
1.2 Radiação Ionizante	7
2. OBJETIVO	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Purificação das toxinas à partir do veneno total	15
3.1.1 <i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	15
3.1.2 <i>Cromatografia em resina de troca iônica</i>	16
3.2 Dosagem de Proteínas	16
3.2.1 <i>Preparação do Reagente de Bradford</i>	17
3.3 Cálculo das concentrações relativas entre "scavenger" e espécies reativas formadas durante a irradiação	18
3.4 Cálculo das concentrações dos "Scavengers"	18
3.5 Irradiação das amostras	20
3.6 Análise de absorção em ultravioleta	20
3.6.1 <i>Princípios de Espectrofotometria de Ultravioleta</i>	20
3.6.2 <i>Procedimento para análise de absorção em ultravioleta</i>	23
3.7 Análise de espectro de fluorescência	24
3.7.1 <i>Princípios da análise de fluorescência</i>	24
3.7.2 <i>Procedimento para análise de Fluorescência</i>	25
3.8 Análise por espectrometria de massa	25
3.8.1 <i>Princípios da espectrometria de massa</i>	25

	Página
<i>3.8.2 Procedimento para análise de massa</i>	27
3.9 Atividade Enzimática	27
<i>3.9.1 Procedimento para análise da atividade enzimática</i>	27
3.10 Verificação da atividade tóxica	28
<i>3.10.1 Procedimento para análise de atividade tóxica</i>	28
3.11 Produção de anticorpos (Ensaio de Imunização)	29
<i>3.11.1 Procedimento do ensaio de imunização</i>	29
3.12 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	30
<i>3.12.1 Princípios do ELISA</i>	30
<i>3.12.2 Procedimento para o Ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Obtenção das toxinas a partir do veneno total	33
4.2 Absorção Ultravioleta	35
4.3 Análise de espectro de fluorescência	43
4.4 Análise por espectrometria de massa	47
4.5 Atividade enzimática	51
4.6 Atividade tóxica	52
4.7 Produção de anticorpos	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Venenos

As serpentes peçonhentas causam cerca de 20.000 acidentes por ano no Brasil, dos quais 100 levam à óbitos (JORGE & RIBEIRO, 1990). Cerca de 85% desses acidentes são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. O gênero *Crotalus* tem um alto índice de letalidade, que chega a 72% dos casos de acidentados sem o tratamento com o soro homólogo e 11% dos casos tratados (ROSENFELD, 1991).

Os venenos ofídicos são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas, peptídeos e, em pequenas proporções, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. Os principais componentes tóxicos são as proteínas e as enzimas (MEYER, 1990).

O veneno crotálico tem vários componentes identificados, dentre eles destacam-se: convulxina, giroxina, delta toxina, crotoxina e crotamina.

A convulxina é uma glicoproteína de peso molecular 72 kDa e teve sua toxicidade estudada em vários modelos animais produzindo, quando inoculada por via intravenosa, os seguintes efeitos: convulsões tônico-clônicas, alterações circulatórias e respiratórias, além de ativar e agregar plaquetas, na ausência de fibrinogênio (VARGAFTIG *et al.*, 1983).

A giroxina apresenta peso molecular de 34 kDa e provoca uma síndrome convulsiva, muito particular em camundongos, caracterizada por movimentos circulatórios do corpo ao longo do seu eixo longitudinal. A giroxina ainda apresenta atividade coagulante do fibrinogênio no plasma de mamíferos, exercendo assim uma atividade do tipo trombina (ALEXANDRE *et al.*, 1988).

A delta toxina é ainda pouco conhecida farmacologicamente, embora tenha sido descoberta uma ação hemoconcentrante, por alteração na permeabilidade vascular (VITAL-BRAZIL, 1980).

A crotoxina é o principal componente do veneno, representando cerca de 60% do seu peso. Ela é uma beta-neurotoxina que possui alta toxicidade específica e é composta por duas sub-unidades ligadas não covalentemente. A crotoxina apresenta, em sua sub-unidade básica, 6 fenilalaninas (posições: 5, 11, 20, 23, 45 e 109) 3 triptofanos (posições: 30, 61 e 80) e 10 tirosinas (posições: 21, 24, 27, 51, 64, 66, 72, 103, 107 e 110), enquanto que a sub-unidade ácida, possui 2 fenilalaninas (posições 2 e 24), 2 tirosinas (posições: 3 e 6) e 1 triptofano (posição 14). A sub-unidade ácida (crotapotina) é enzimaticamente inativa, não possui toxicidade e é constituída por três polipeptídeos ligados por pontes dissulfeto (BON *et al.*, 1986). A crotapotina potencializa a ação da fosfolipase (sub-unidade básica) uma vez que a direciona para receptores específicos.

Embora seja derivada de uma seqüência precursora da fosfolipase A_2 , a crotapotina não apresenta atividade enzimática, responsável pela ruptura da membrana celular e liberação de acetilcolina do córtex cerebral (AIRD *et al.*, 1985).

A fosfolipase A_2 é básica e pouco tóxica, entretanto, quando desligada da crotapotina, pode bloquear a transmissão neuromuscular como a crotoxina, exigindo, contudo, uma quantidade maior para causar o mesmo efeito. A alta afinidade da fosfolipase A_2 por membrana pode ser mascarada pela crotapotina, que funciona como carreador, que lhe confere uma maior especificidade por levá-la ao sítio neuromuscular. Sucedendo-se a este fato, possivelmente ocorre a dissociação do complexo (fosfolipase A_2 - crotapotina) quando este atinge o sítio,

favorecendo a ação específica da fosfolipase A₂ sobre sítios sinápticos (RADVANYI *et al.*, 1985). Essa ação causa bloqueio da transmissão neuromuscular pré-sináptica em três etapas sucessivas: Inicialmente um efeito depressor, seguido por uma breve facilitação da liberação do transmissor e finalmente um bloqueio final da liberação da acetilcolina do nervo motor terminal (GALLACCI *et al.*, 2000).

A crotoxina pode agir como neurotoxina pós-sináptica provavelmente levando os receptores colinérgicos a um estado conformacional inativo. A atuação da crotoxina leva a crer que deve haver uma ação conjunta entre suas duas sub-unidades (fosfolipase A₂ e crotapotina). Possivelmente a associação das duas sub-unidades promove alterações estruturais que favorecem a atividade biológica (LI *et al.*, 1994).

A crotamina é um polipeptídeo fortemente básico, peso molecular de 4882 Da, composta por 42 aminoácidos, firmemente reticulados por três pontes dissulfeto, que lhe confere uma forma compacta. A seqüência primária da crotamina (FIGURA 1) exhibe alto grau de homologia com miotoxinas (LAURE, 1975). A crotamina possui 7 resíduos de aminoácidos aromáticos: uma tirosina (Tyr-1), duas histidinas (His-5 e His-10), dois triptofanos (Trp-32 e Trp-34) e duas fenilalaninas (Phe-12 e Ph-25). Desses aminoácidos seis são conservados na família das miotoxinas, exceto pela Phe-25 (ENDO *et al.*, 1989).

A crotamina (FIGURA 2) tem alto conteúdo de lisina (9 resíduos), baixo de arginina (2 resíduos) e não possui valina, treonina e alanina. O N terminal é a tirosina e o C terminal é a glicina (MITAKE *et al.*, 2001).

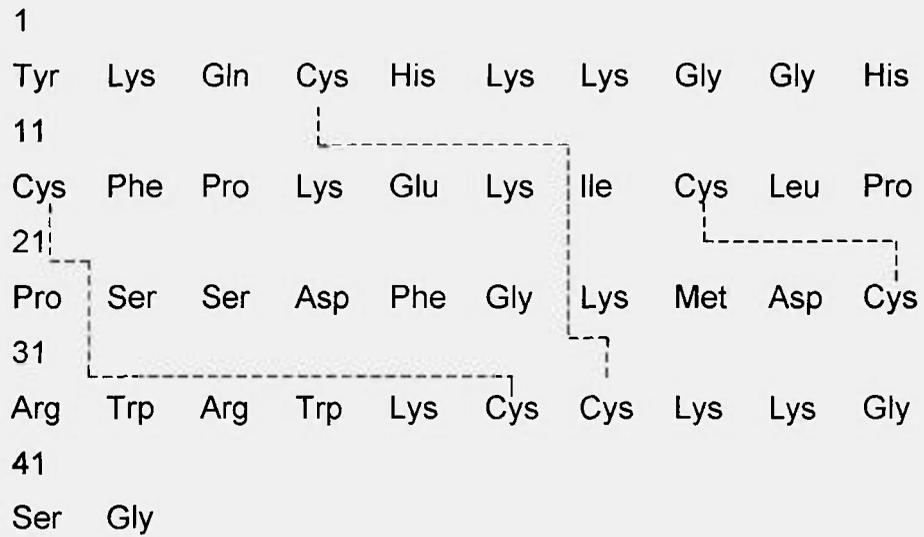


FIGURA 1. Seqüência primária da crotamina com indicação das pontes dissulfeto (Beltran *et al.*, 1990).



FIGURA 2. Estrutura tridimensional das cadeias carbônicas da crotamina (NICASTRO *et al.*, 2003).

Esta toxina pode causar contração dos músculos esqueléticos devido a sua ação na membrana de fibras musculares causando um aumento de influxo de sódio (FIGURA 3). Portanto os efeitos tóxicos da crotamina podem ser explicados devido às alterações cinéticas dos canais de sódio (MATAVEL *et al.*, 1998).



FIGURA 3. Efeito característico da crotamina após injeção de 2 mg/kg pela via intraperitoneal (Mitake, 2000).

A constituição do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, devido à presença de crotamina, é denominado: crotamina positivo e crotamina negativo. As serpentes que possuem venenos crotamina positivo podem ser encontradas à oeste do Estado de São Paulo e as crotamina negativo, à leste do Estado, tendo ainda uma região do estado que é híbrida, coexistindo ambos os tipos de veneno (SCHENBERG, 1959a).

TOYAMA *et al.*, (2000) isolaram duas isoformas da crotamina, denominadas F2 e F3. Essas isoformas isoladas possuem estrutura tridimensional idêntica, apesar de apresentarem 1 ou 2 resíduos de aminoácidos diferentes entre elas. Ambas as isoformas produziram paralisia espástica em camundongo e apresentaram a mesma DL 50 (0,5 mg/kg de camundongo). Por outro lado, apenas a isoforma F2 afetou a secreção de insulina em ilhota de rato.

TOYAMA *et al.*, (2003) estudaram a ação farmacológica e histopatológica destas isoformas chegando a conclusão de que elas agem no influxo de sódio causando paralisia das fibras musculares que pode progredir para mionecrose. Os autores sugerem ainda a ação dessas isoformas em canais de cálcio.

A crotamina, em razão da sua forma compacta, é resistente à variação de temperatura. Assim, a depender das condições às quais é submetida, ela pode se auto-associar formando dímeros, trímeros ou ainda n-meros. Condições como o pH por exemplo pode ocasionar este efeito (HAMPE *et al.*, 1977e 1990).

Alguns trabalhos reportam sobre as análises da crotamina por ressonância nuclear magnética (NMR). ENDO *et al.*, (1989) analisaram a toxina por esta técnica, sugerindo que a crotamina apresenta dois estados estruturais diferentes em solução. Essas estruturas coexistem e podem refletir isômero *cis-trans* dos resíduos de prolina ou pode ocorrer uma dimerização da molécula com uma ponte dissulfeto intermolecular fazendo a ligação entre as duas sub-unidades.

Quando a toxina está em seu estado dimérico, a posição da ligação peptídica no isômero *cis* está entre a leucina-19 e a prolina-20 . Já para o isômero *trans* a ligação se localiza entre a prolina-13 e a prolina-21.

A análise do potencial eletrostático da crotamina indicou a presença de região com potencial positivo, negativo e neutro, sugerindo que a região com potencial positivo pode ser responsável pela toxicidade da molécula e que a região neutra e negativa são as responsáveis pela afinidade e especificidade da crotamina por canais de sódio.

1.2 Radiação Ionizante

A ionização é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para tecidos biológicos. É o processo pelo qual um ou mais elétrons são retirados das camadas mais externas de um átomo ou molécula, resultando na formação de um par iônico, negativo ou positivo.

Em adição à ionização, ocorre a excitação, onde um elétron, da camada externa de um núcleo-alvo, absorve energia suficiente para elevar seu estado energético, permanecendo associado ao átomo e emitindo energia sob forma de radiação visível ou ultravioleta (GROSCH & HOOPYWOOD, 1979).

A radiação, por promover desdobramento das moléculas protéicas, as tornam mais sensíveis aos outros fatores físico-químicos. Além disso, a radiação pode colaborar para a formação de ligações covalentes intermoleculares levando ao surgimento de dímeros, trímeros e outros.

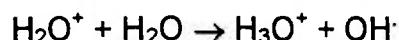
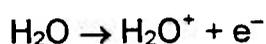
A irradiação de proteínas, em solução aquosa, tem sido estudada por causar mudanças químicas, alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias secundárias e terciárias das proteínas. Estas mudanças estão relacionadas com perda de atividade biológica além de poder interferir nas propriedades imunológicas após a irradiação.

Sabe-se que a energia absorvida da radiação ionizante pode inativar materiais biológicos por dois meios:

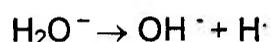
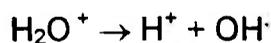
- **Efeito Direto:** observado quando a ionização é produzida na própria molécula durante a irradiação.
- **Efeito Indireto:** resultado das reações entre moléculas estudadas e os produtos de interação da radiação com a água ou outros solventes.

Quando um composto é irradiado em solução, o efeito indireto se associa ao direto.

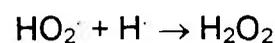
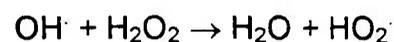
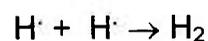
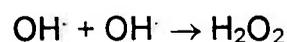
Esses efeitos em macromoléculas são potencializados quando o fenômeno ocorre em solução aquosa. Há uma deposição da maior parte da energia da radiação nas moléculas de água, cujo processo é denominado de radiólise da água. As equações abaixo podem elucidar melhor este fenômeno:



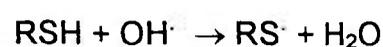
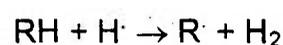
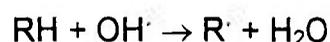
Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis podendo dissociar-se em:

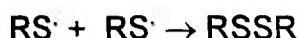


Os radicais H^\cdot e OH^\cdot formados apresentam-se extremamente reativos, como:



A energia depositada na solução não é distribuída de forma homogênea na molécula. Esses produtos primários da radiólise da água reagem com certos grupamentos da molécula provocando danos como se nota abaixo:





Sendo assim, a irradiação da água ou de soluções aquosas consiste em um "ato primário", produzindo espécies moleculares e radicais livres, os quais possuem alto poder de reação com as moléculas. As principais espécies formadas, acompanhadas de seus respectivos rendimentos para 100 eV de energia absorvida (valor de G), destacam a importância destas espécies reativas:



Sabe-se que as principais espécies reativas causadoras de danos em macromoléculas, radical hidroxila ($OH\cdot$) e elétron aquoso ($e^-_{aq.}$), formadas no processo de radiólise da água durante a irradiação em solução, atuam sobre a molécula protéica causando modificações importantes.

O radical hidroxila é destacado por muitos autores como importante responsável por danos às macromoléculas (ADAMS *et al.*, 1972a ; ADAMS & POSENER, 1979; MILLIGAN *et al.*, 1993). Ele reage com a proteína principalmente pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa ao grupo carboxílico e de grupos sulfidrilas, além de reagir com anéis aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos (BUTLER *et al.*, 1984).

Os elétrons aquosos ($e^-_{aq.}$) reagem com os hidrogênios dos aminoácidos aromáticos da mesma forma que os radicais hidroxilas, além de promoverem a desaminação de aminoácidos como a alanina, arginina, glicina, histidina, cisteína, cistina e aromáticos (BUTLER *et al.*, 1984).

A fragmentação da proteína em solução aquosa é afetada pela conformação local dos aminoácidos nas proteínas, acessibilidade para os produtos de radiólise da água e seqüência dos aminoácidos primários (MOON & SONG, 2001).

A albumina bovina vem sendo alvo de vários pesquisadores e apresenta um peso molecular de 66.000 Da. Apresenta uma ligação peptídica simples, dois resíduos de triptofano, um grupo S-H e mais dezessete grupos S-S (SCHUESSLER & SCHILLING, 1984).

Esta proteína quando irradiada em condições anaeróbias, com baixas doses, forma poucos agregados, porém quando irradiada com doses maiores do que 1200 Gy, observa-se grande agregação. Por outro lado, na presença de oxigênio, a irradiação da albumina não apresenta formação significativa de agregados, mesmo com altas doses.

Isto ocorre devido ao fato de que a albumina contém poucos resíduos de triptofano, uma vez que quanto maior a quantidade destes resíduos, maior a oxidação promovida pela radiação. Sendo assim as proteínas com maior quantidade de resíduos de triptofano são mais radiosensíveis e deste modo protegem as ligações peptídicas do ataque dos radicais hidroxilas, inibindo a degradação e, conseqüentemente, a agregação (SCHUESSLER & SCHILLING, 1984).

Evidências também existem no sentido de que o grau de degradação das proteínas oxidadas diminui com o seu envelhecimento. O dano às proteínas pode ser visto como um desvio do "ciclo de vida" normal das proteínas, eficientes máquinas de condução aos processos celulares essenciais.

Se alguns desses processos são alterados significativamente, então certamente conseqüências danosas podem ser esperadas. Isto pode ocorrer

quando as proteínas são submetidas à ação das espécies reativas do oxigênio (FLOYD *et al.*, 2001).

A extensão do dano da radiação pode ser estudada e modificada pela adição, no momento da irradiação, de seqüestradores “scavengers” que possuem a capacidade de competir no meio pelas espécies reativas específicas, impedindo a ação das mesmas na molécula.

Observa-se que na inativação de algumas proteínas como a albumina bovina e a ovomucóide, quando o N_2O está presente durante a irradiação, o elétron aquoso é rapidamente transformado em radical hidroxila (YANG *et al.*, 1996). Sabe-se ainda que sais inorgânicos, em solução de N_2O saturado, convertem o elétron aquoso em radical hidroxila e este radical reage com o sal para formar o ânion do seu respectivo sal.

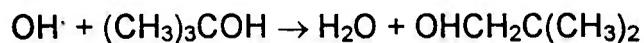
O mais versátil radical ânion para o uso em estudos de proteínas é o $(CNS)_2^-$ e o Br_2^- devido a alta seletividade quando reage com outras proteínas (YANG *et al.*, 1996).

Existem outros produtos que podem ser utilizados como “scavengers”, um deles é o ácido ascórbico que consegue reagir com os radicais livres formados na radiólise da água (MOON & SONG, 2001).

Outros compostos orgânicos como os álcoois e as etanolaminas podem ser usados como “scavengers” para radicais hidroxilas.

Quando proteínas são irradiadas, ocorrem alterações químicas como fragmentação, *cross-link*, agregação e oxidação por radicais oxigênio gerados na radiólise da água. Estas mudanças dependem da natureza química e estado físico das proteínas, além das condições de irradiação, como fonte, dose, temperatura e outros.

Compostos com radicais sulfidrilas, por serem doadores de hidrogênio, são eficientes “scavengers” de radicais hidroxilas, mesmo em baixas concentrações. Azida sódica, L- histidina, acetato de nitrila, álcoois metílico, etílico, isopropílico e butílico (MILLIGAN *et al.*, 1993), iodeto de potássio, manitol e etanol, íons tiocianato (ADAMS *et al.*, 1972a; ADAMS *et al.*, 1972b; ADAMS & POSENER, 1979), DL- ditioneitol (DTT), cisteína e álcool butílico terciário mostram-se efetivos radioprotetores, a depender das concentrações e dos sistemas utilizados. Dentre eles, o álcool butílico terciário apresenta algumas vantagens por produzir radicais não reativos e que desaparecem rapidamente do processo.



Foi observado que vários tipos de álcoois podem ser “scavengers” de radicais hidroxilas durante a irradiação com raios gama, protegendo bactérias *Escherichia coli* de danos provavelmente causados por este radical. Quando o álcool foi apenas incubado junto às bactérias e retirados antes da irradiação, notou-se uma radiosensibilidade das culturas, que foi diretamente proporcional à hidrofobicidade dos álcoois utilizados.

Como “scavenger” de elétron aquoso destacam-se o oxigênio, que age convertendo rapidamente em radicais ânions superóxidos os elétrons aquosos e hidrogênios em sua forma ácida e íons nitrato, que se mostram efetivos seqüestradores de elétron aquoso, mas não de radical hidroxila.

Vários fatores interferem na obtenção do efeito final da irradiação de proteínas a saber: presença de oxigênio, tipo de fonte de radiação, dose e taxa de dose, temperatura de irradiação, tipo de solvente, presença de gases e radiomodificadores, estado físico, concentração e pH. Desta maneira, o efeito final da irradiação de proteínas e, por conseguinte, de venenos ofídicos pode ser

diferente, qualitativa e quantitativamente, de acordo com as condições empregadas (PURANANANDA, 1972).

Conforme anteriormente descrito, muito estudos são feitos para a destoxicação de venenos ofídicos de várias espécies e utilizando diversas metodologias. Dentre os quais a radiação ionizante tem se mostrado uma ferramenta bastante eficaz para este fim, por diminuir a toxicidade dos venenos preservando as suas propriedades imunogênicas, sem o auxílio de quaisquer substâncias que poderiam agir como imunógenos no processo.

Cabe ressaltar que a imunologia envolvida neste processo está sendo continuamente bem esclarecida por diversos trabalhos que reportam, por exemplo, os mecanismos os quais a toxina irradiada é melhor reconhecida pelo macrófago quando irradiada.

Por outro lado a parte que concerne os processos químicos que ocorrem com a toxina após a sua irradiação não estão bem esclarecidos.

Sendo assim, verifica-se a importância de se entender o papel das principais espécies reativas formadas durante o processo de irradiação de toxinas.

2. OBJETIVO

De uma maneira geral o presente trabalho visou estudar as possíveis alterações nas estruturas das proteínas quando submetidas à radiação gama de ^{60}Co .

Especificamente, foram avaliadas as alterações estruturais causadas pela irradiação de duas toxinas (crotoxina e crotamina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, utilizando três doses de radiação (400, 2000 e 10000 Gy).

Além disso foram avaliadas as participações de dois dos principais produtos de radiólise da água (radical hidroxila e elétron aquoso), gerados durante a irradiação das toxinas em solução.

O Veneno utilizado nos experimentos se encontrava na forma liofilizada e foi obtido junto ao Centro de Estudo de Venenos de Animais Peçonhentos (CEVAP) em Botucatu, São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados para elaboração dos experimentos foram de qualidade pró análise. A água utilizada para o preparo das soluções foi destilada em aparelho de vidro e depois passadas em sistema Milli Q.

Os animais utilizados foram camundongos "Swiss" machos com massas corpóreas entre 20 e 30g do biotério do IPEN, sendo sempre mantidos em gaiolas e meios absorventes (maravalha de pinho) freqüentemente trocadas e com alimentação adequada e água *ad libitum*.

3.1 Purificação das toxinas à partir do veneno total:

3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

Cerca de 150 mg de veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, na forma liofilizada, foram dissolvidos em 2 mL de tampão formiato de amônio 100mM, pH 3. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 201 g, o sobrenadante foi aplicado à uma coluna de gel filtração Superdex 75, equilibrada com o tampão de formiato de amônio 100mM pH 3. As frações foram coletadas em coletor automático do sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) com determinação contínua da absorvância em comprimento de onda de 280 nm. As frações que continham os picos principais foram acondicionadas em frascos de vidro, congeladas e liofilizadas para posterior uso nas análises.

3.1.2 Cromatografia em resina de troca iônica

A crotoxina, anteriormente semi-purificada e liofilizada, foi ressuspenida em tampão em 2 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,3 e aplicada a uma resina de troca iônica do tipo Mono Q em um sistema FPLC, previamente estabilizada no mesmo tampão. Após a adsorção, a crotoxina ligada à resina foi eluída pela passagem de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5 M em tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,3. A absorvância foi verificada automaticamente em 280 nm. As frações contendo a crotoxina foram acondicionadas juntas e dialisadas, à exaustão, contra água. A membrana utilizada foi SPECTRAPOR[®] de capacidade entre 0 a 12000 Da. Em seguida, crotoxina foi congelada, liofilizada e mantida em "freezer" à menos 24° C, para ser utilizada posteriormente.

A crotamina, também previamente semi-purificada, foi ressuspenida em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 e aplicada em uma resina do tipo Resource S em sistema FPLC, estabilizada no mesmo tampão. Após a adsorção, a crotamina ligada à resina foi retirada com a passagem de um gradiente linear salino de 0 a 2 M de NaCl. A absorvância foi automaticamente verificada em 280 nm. As frações contendo a crotamina foram acondicionadas no mesmo recipiente. Posteriormente a crotamina foi dialisada e a membrana utilizada era da SIGMA[®], de capacidade entre 0 e 3000 Da, congelada, liofilizada e mantida em freezer com temperatura de menos 24° C para ser utilizada posteriormente.

3.2 Dosagem de Proteínas

Para padronizar as concentrações das proteínas nos testes, deve-se determinar o conteúdo protéico destas amostras. O método utilizado foi aquele padronizado por BRADFORD (1976), cuja reação baseia-se na capacidade das

proteínas interferir com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional de cor, detectável em 595 nm.

3.2.1 *Preparação do Reagente de Bradford*

Inicialmente pesou-se cerca de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, dissolveu-se este reagente em 50 mL de etanol e adicionaram-se cerca de 100 mL de ácido fosfórico 85%. Esta solução foi levada ao volume final de 1000 mL com água destilada em um sistema Milli Q®.

Para elaborar a curva padrão de proteína, realizou-se uma pipetagem seriada da albumina humana.

As concentrações em $\mu\text{g/mL}$ foram de 1, 0,5, 0,250, 0,125, 0,0625 e 0,03125 em solução salina e para o “branco” se utilizou apenas solução salina e o reagente anteriormente preparado.

As densidades ópticas foram obtidas em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 595 nm. Os dados obtidos, utilizando as soluções de albumina, possibilitaram a obtenção de uma função linear: $Y = A x + B$, sendo Y- concentração da proteína, x - absorvância à 595 nm, A – coeficiente angular da reta e B constante inicial da reta. A correlação dos resultados foi alta com $r^2 = 0,9934$.

3.3 Cálculo das concentrações relativas entre “scavenger” e espécies reativas formadas durante a irradiação

A taxa de dose com a qual as toxinas foram irradiadas foi de 5,17 kGy/h ou 86,16 Gy/min, logo transformando-se as unidades de Gy para eV tem-se:

$$1 \text{ Gy} - 6,6 \times 10^{15} \text{ eV}; \text{ logo em } 400 \text{ Gy tem-se } 2,64 \times 10^{18} \text{ eV}$$

Então se para 1 eV formam-se 0,027 elétron aquoso e 0,03 radical hidroxila, para dose 400 Gy ou $2,64 \times 10^{18}$ eV produz $7,13 \times 10^{16}$ moléculas de e^-_{aq} e $8,45 \times 10^{16}$ moléculas de OH \cdot .

Para 2000 Gy o procedimento é o mesmo, ou seja, se 1 Gy é o mesmo que $6,6 \times 10^{15}$ eV; em 2000 Gy tem-se $1,32 \times 10^{19}$ eV, produzindo $3,56 \times 10^{17}$ e^-_{aq} e $4,22 \times 10^{17}$ OH \cdot .

Finalmente, para 10000 Gy a energia em eV é $6,6 \times 10^{19}$ e essa energia produz $1,78 \times 10^{18}$ e^-_{aq} e $2,11 \times 10^{18}$ OH \cdot .

Com os valores estimados das concentrações dos produtos de radiólise formados pode-se então calcular a concentração dos “scavengers” a ser usada.

3.4 Cálculo das concentrações dos “scavengers”

Para os cálculos das concentrações dos “scavengers”, levou-se em consideração que a concentração relativa entre os produtos formados e os “scavengers” é igual a 1, ou seja para cada molécula de radical livre formado 1 molécula de “scavenger” atuando no meio.

Desta feita o cálculo das concentrações foi o seguinte:

400 Gy

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $7,13 \times 10^{16}$ $e^-_{aq.}$; logo a concentração do “scavenger” para elétron aquoso é de 0,12 μ M.

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $8,45 \times 10^{16}$ OH \cdot ; logo a concentração do “scavenger” para radical hidroxila é de 0,14 μ M.

2000 Gy

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $3,56 \times 10^{17}$ $e^-_{aq.}$; logo a concentração do “scavenger” para elétron aquoso é de 0,60 μ M.

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $4,22 \times 10^{17}$ OH \cdot ; logo a concentração do “scavenger” para radical hidroxila é de 0,70 μ M.

10000 Gy

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $1,78 \times 10^{18}$ $e^-_{aq.}$; logo a concentração do “scavenger” para elétron aquoso é de 3,00 μ M.

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $2,11 \times 10^{18}$ OH \cdot ; logo a concentração do “scavenger” para radical hidroxila é de 3,50 μ M.

Apesar de calculadas as concentrações dos “scavengers” que deveriam ser utilizadas para cada dose de radiação, por uma questão de precisão das

medidas, adotou-se a concentração referente a 10000 Gy para todas as doses, uma vez que esta concentração, assegurava a proteção para todas as amostras.

3.5 Irradiação das amostras

As amostras de crotamina e crotoxina, previamente purificadas, com concentração de 2mg/mL, na presença ou não de “scavenger”, foram irradiadas com doses de 400, 2000 e 10000 Gy com taxa de dose de 5,17 kGy/h em uma fonte de ^{60}Co Gammacell 220. Os “scavengers” utilizados foram o t-butanol que atua como “scavenger” de radical hidroxila e o nitrato de sódio que é “scavenger” de elétron aquoso.

3.6 Análise de absorção em ultravioleta

Para avaliar possíveis alterações na estrutura das toxinas, fez-se análise da absorção em ultravioleta.

3.6.1 Princípios de Espectrofotometria de Ultravioleta

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia, em estado excitado. Para muitas das estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta.

A seletividade da absorção no ultravioleta é uma vantagem, uma vez que se podem reconhecer grupos característicos em moléculas que possuem complexidade variável (JAFPE & ORCHIN, 1962).

A região ultravioleta próximo é importante e estende-se de 200 a 380 nm. A atmosfera é transparente nesta região, o que a torna facilmente acessível com o uso de ótica de quartzo. A absorção de energia da região ultravioleta produz modificação da energia eletrônica das moléculas em consequência de transições de elétrons de valência da molécula. As transições correspondem à excitação de 0.um elétron de um orbital molecular totalmente ocupado (usualmente um orbital π não ligante ou um orbital π ligante) a um orbital de energia superior (geralmente o primeiro orbital antiligante π^* ou σ^*). Um orbital antiligante é designado pelo asterisco (*). Assim por exemplo, indica-se a transição de um elétron de um orbital ligante π para um orbital antiligante π^* por $\pi \rightarrow \pi^*$.

As características principais de uma banda de absorção são: a sua posição e a sua intensidade. A posição de absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra transição eletrônica. Já a intensidade de absorção depende de dois fatores: a probabilidade de interação da energia radiante e o sistema eletrônico, de modo a permitir a passagem do estado fundamental a um estado excitado e a polaridade do estado excitado. A probabilidade da transição é proporcional ao quadrado do momento da transição. O momento de transição, por sua vez é proporcional à variação da distribuição de carga eletrônica que ocorre durante a excitação. Observa-se uma absorção intensa quando a transição é acompanhada por grande variação do momento de transição. A intensidade de uma absorção pode ser expressa em transmitância (T) definida como:

$$T = I / I_0$$

Onde: I_0 – é a intensidade da energia radiante que incide na amostra e I – é a intensidade da radiação que emerge da amostra. Uma expressão mais conveniente para intensidade de absorção é obtida pela lei de Lambert-Beer que estabelece uma relação entre a transmitância, a espessura da amostra e a concentração das espécies que absorvem. A relação é:

$$\log_{10} (I / I_0) = k \cdot b \cdot c = A$$

onde: k = constante característica do soluto

c = concentração do soluto

b = comprimento do caminho ótico através da amostra

A = absorvância

Quando “ c ” é expresso em mols por litro e o comprimento do caminho ótico em centímetros, a expressão acima se torna:

$$A = \epsilon c b$$

Onde: ϵ - é a absortividade molar.

As características de absorção para moléculas orgânicas na região do ultravioleta dependem das transições eletrônicas que podem ocorrer e os efeitos do ambiente em que estão os átomos sobre as transições.

O espectro de uma proteína no ultravioleta pode ser dividido em três partes distintas: acima dos 280 nm entre 280 nm e 210 nm e abaixo de 210 nm.

A região acima dos 280 nm traduz apenas as bandas relativas aos cromóforos das cadeias laterais dos seguintes aminoácidos: Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina (Phe), além das pontes dissulfeto.

A região compreendida entre 280 e 210 nm é mais complexa e traduz, além da primeira banda relativa ao grupo peptídico, a contribuição de outros aminoácidos não aromáticos: Metionina (Met), Cisteína (Cys) e Histidina (His) além dos grupamentos sulfidrilas livres.

Já a terceira região é a mais complexa de todas, ela trás informações sobre as bandas relativas às transições dos grupos peptídicos e de sua dependência com a conformação da proteína, além das demais transições relativas as transições relativas a todos os demais aminoácidos que constituem a proteína.

Deve ficar claro que o espectro experimental de uma proteína não é a simples soma dos espectros fundamentais de cada uma das partes que as compõem, isto porque a conformação da proteína leva a maior ou menor exposição de determinados grupos, fazendo com que as interações entre soluto-soluto e solvente-soluto, sejam diferentes e quase específicas para cada tipo de proteína e dos resíduos, topologicamente próximos que a constituem (JAFJE & ORCHIN, 1962).

3.6.2 Procedimento para análise de absorção em ultravioleta:

As amostras de crotoxina e crotamina, nativas e irradiadas, na presença ou não de "scavenger" foram analisadas no intervalo de 200 a 360 nm, em espectrofotômetro modelo Ultrospec III (Pharmacia LKB – Biotech), com registro automático nos diversos comprimentos de onda. As leituras foram obtidas contra um "branco" (solução de cloreto de sódio 150 mM, que foi utilizada para dissolver as amostras).

3.7 Análise de espectro de fluorescência

A análise de fluorescência permitiu a análise estrutural da proteína principalmente por aminoácidos aromáticos.

3.7.1 Princípios da análise de fluorescência

Os espectros de fluorescência para as proteínas dependem ou envolvem somente três tipos de resíduos de aminoácidos ditos aromáticos, ou seja o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. A excitação destes resíduos, por radiação ultravioleta leva-os a estados excitados e quando retornam ao estado fundamental emitem fluorescência, por meio de um processo que é composto por duas etapas: a primeira é via dissipação não radioativa (por exemplo: agitação térmica intramolecular) e a segunda, via decaimento radioativo exponencial do fluoróforo, sendo que a proteína apresenta uma emissão fluorescente intrínseca (CHEN *et al.*, 1969).

O tempo de duração das etapas citadas acima é bem distinto. Assim a primeira etapa ocorre rapidamente, possibilitando uma distinção clara entre a radiação de excitação e emissão, já que as energias envolvidas no processo são diferentes.

A primeira etapa traduz uma transferência de energia não radioativa segundo o mecanismo: processo de colisão com outras moléculas, transições diversas sem emissão, reorientação do fluoróforo ou da molécula como um todo, além de é claro das transferências de calor propriamente ditas.

A segunda etapa (decaimento exponencial) engloba os seguintes aspectos: transferência de energia entre os fluoróforos (dependendo da geometria molecular, separação e orientação das moléculas); supressão ("quenching") com outras

moléculas ou íons (dependendo do acesso do fluoróforo na estrutura molecular); cinética de declínio da emissão fluorescente e grau de despolarização da radiação emitida.

Logo, pelo que acaba de ser descrito, existe a possibilidade de distinguirem-se qualitativamente os fluoróforos intrínsecos, embora não possa ser descartada a transferência de energia entre os fluoróforos (CHEN *et al.*, 1969).

3.7.2 Procedimento para análise de Fluorescência

As amostras de crotoxina e crotamina, nativas e irradiadas, na presença ou não de “scavenger”, foram submetidas à análise das alterações intrínsecas, num espectrofotômetro de fluorescência F2000 da marca Hitachi®. Foi utilizado o comprimento de onda de excitação do triptofano que é de 275 nm. A concentração das amostras foi de 5 µg/mL. As leituras foram efetuadas contra um “branco” de Tampão fosfato de amônio 50 mM pH 7,8.

3.8 Análise por espectrometria de massa

Esta técnica possibilita a investigação de mudanças estruturais de proteínas pelas massas dos compostos analisados.

3.8.1 Princípios da espectrometria de massa

Por definição o espectrômetro de massa consiste em uma fonte de íons, um analisador de massa que mede a relação carga massa (m/z) do analito ionizado e um detetor que registra o número de íons em cada valor de m/z .

Para que uma análise possa ser realizada, as amostras devem ser ionizadas, sendo assim dois métodos são comumente utilizados: A ionização por

“electrospray” (ESI) e ionização e desorção por laser da matriz assistida (MALDI) (AEBERSOLD & MANN, 2003).

A ESI opera em pressão atmosférica e produz minúsculas gotas carregadas. O processo de ESI pode ser usado para produzir íons positivos ou negativos, porém no caso das proteínas e peptídeos geralmente utiliza-se o modo positivo.

Quando um fluxo alto de solvente (100 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 1 mL/min) é usado, necessita-se de um nebulizador de gás para acompanhar a dispersão do solvente. Porém quando o fluxo é baixo o “electrospray” pode ser induzido por potencial elétrico(LIN *et al.*,2003).

Outra característica do ESI é a produção de íons com múltiplas cargas que diminuem os valores de m/z permitindo a análise de moléculas com alta massa molecular.

Os íons gerados por essas fontes passam por um analisador de massa. Esse analisador é responsável por separar os íons por sua relação carga massa (m/z). Ele usa um campo elétrico e/ou magnético para conduzir os íons no modo massa-dependente.

O quadrupólo é um tipo de analisador, que usa uma radiofrequência aplicada por quatro bastões de metal com polaridade de radiofrequência alternadas e colocados em lados opostos. Uma corrente direta reveste os bastões. A interação entre a radiofrequência e a corrente direta estabiliza a trajetória dos íons de valores m/z particulares que passam pelo analisador.

Os íons presentes no quadrupólo colidem com moléculas de gás fazendo assim a fragmentação. Os íons fragmentados são então seqüencialmente ejetados para o detetor. O analisador de massa TOF acelera um conjunto de íons

com potencial elétrico e os diferenciam pelo tempo que eles levam para atravessar o tubo de vôo. Com os valores de (m/z) pode-se calcular o tempo requerido para mover os íons da fonte até o detetor (LIN *et al.*,2003).

3.8.2 Procedimento para análise de massa

As amostras de crotamina nativa e irradiada foram submetidas a análise de espectrometria de massa. As amostras foram injetadas em um volume de 20 µL de uma solução à 2 mg/mL, tendo assim uma massa final de 40 µg. O aparelho utilizado foi um quadrupólo da micromass (Q-TOF – ES/MS).

3.9 Atividade Enzimática

A atividade enzimática da crotoxina foi avaliada de acordo com o método de HOLZER & MACKESSY (1996) modificado. Este método utiliza um substrato sintético orgânico [*4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid*] que mede a exposição dos cromóforos junto ao substrato, em um comprimento de onda de 425 nm. Devido a uma limitação de substrato, houve a necessidade de se padronizar o método para utilizá-lo em placas de microtitulação de 96 poços. No protocolo original utilizam-se 100 µL do substrato enquanto que na placa utilizam-se cinco vezes menos.

A atividade enzimática foi estimada utilizando uma única concentração. As variáveis foram as doses de radiação e a presença ou não de substâncias “scavenger”.

3.9.1 Procedimento para análise da atividade enzimática

Inicialmente 20 μL das amostras de crotoxina (4 mg/mL) nativa e irradiada (400, 2000 e 10000 Gy), na presença ou não de substância “scavenger”, foram colocadas individualmente em 100 μL de solução tampão (10 mM Tris- HCl, 10 mM de CaCl_2 , 100 mM de NaCl; pH 8). Em seguida, foram adicionados em uma microplaca, 20 μL de substrato [4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid] 3 M em acetonitrila). A placa foi homogeneizada e colocada em banho de água a 37° C por 20 minutos. Para interromper a reação adicionaram-se 20 μL de solução de Triton X-100 2,5%. A placa foi colocada no gelo por mais 20 minutos e posteriormente a absorvância foi verificada em 425 nm em leitor de microplacas marca Dynatech® modelo MR - 4000. Para os cálculos da atividade enzimática, foi levado em consideração que a variação de absorvância 0,1 em 425 nm, seria equivalente a 25 nM de cromóforo liberado.

3.10 Verificação da atividade tóxica

Para verificar a atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada com ou sem “scavenger” foi realizado o experimento de medida de toxicidade aguda (DL 50%) na qual se avalia a dose letal capaz de matar 50% dos animais. A dose letal utilizada foi a descrita por AIRD *et al.*, (1985) e que corresponde à 0,06 $\mu\text{g/g}$ de animal.

3.10.1 Procedimento para análise de atividade tóxica

O experimento de toxicidade aguda (DL 50) seguiu o procedimento de dose individual, ou seja, a solução estoque das toxinas para o inóculo na concentração desejada foi diluída em solução de cloreto de sódio 150 mM para 0,1 vez a dose pretendida. Foram utilizadas três doses a saber: 0,06 $\mu\text{g/g}$ (1 DL50), 0,30 $\mu\text{g/g}$ (5

DL50), 0,60 $\mu\text{g/g}$ (10 DL50). O volume injetado por camundongo, em μL , foi 10 vezes a sua massa corpórea em gramas; ou seja, um camundongo de 20 g que recebeu 200 μL de uma solução 0,0003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ resultou em uma dose de 0,06 $\mu\text{g/g}$ da massa seca da toxina por grama de animal. A via de inoculação foi a intraperitoneal. Para cada dose letal foram utilizados 12 grupos de 4 camundongos, com massa corpórea variando entre 18 e 30 g. A mortalidade dos animais foi acompanhada por 48 horas. A toxicidade das amostras foi realizada pela comparação da mortalidade entre as amostras nativas e irradiadas na presença ou não de "scavengers".

3.11 Produção de anticorpos (Ensaio de Imunização)

Para verificar a produção de anticorpos contra a crotoxina nativa e irradiada na presença ou ausência de "scavenger" realizou-se o ensaio de imunização

3.11.1 Procedimento do ensaio de imunização

Foram feitas três imunizações onde a crotoxina nativa e irradiada na presença ou ausência dos "scavengers" foram utilizadas como antígenos.

TABELA 1. Esquema para a imunização dos camundongos.

Tempo (dias)	Dose Inoculada	Volume	Via de inoculação	Adjuvante
1	2,0 μg	200 μL	Sub-Cutânea	FC
15	2,0 μg	200 μL	Sub-Cutânea	FI
21	2,0 μg	200 μL	Intraperitoneal	SF

FC - Adjuvante Completo de Freund; FI - Adjuvante Incompleto de Freund e SF - Solução Fisiológica (NaCl, 150 mM)

Em todos os casos os animais anestesiados, foram sangrados pela via retro-orbital antes de cada inóculo, sendo a sangria final realizada sete dias após o último inóculo., utilizando uma pipeta de "Pasteur", o sangue foi acondicionado em tubos do tipo "eppendorf", já previamente preparados com heparina. Esses tubos foram centrifugados por 10 minutos a 201g e o plasma foi separado e congelado para posterior verificação dos anticorpos produzidos.

3.12 Ensaio imunoenzimático (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)

Para avaliar a produção dos anticorpos formados durante o processo de imunização utilizou-se o ensaio imunoenzimático.

3.12.1 Princípio do ELISA

O ELISA é um ensaio de ligação direta ao anticorpo (ou antígeno), para isso necessita de preparação pura de um antígeno ou anticorpo conhecido, a fim de padronizar o ensaio. Com isso uma enzima liga-se quimicamente ao anticorpo, que se liga ao poço de uma microplaca, que irá adsorver uma certa quantidade de qualquer proteína. O anticorpo de interesse pode ligar-se ao antígeno, sob condições em que a adsorção inespecífica é bloqueada e quaisquer anticorpos não ligados e outras proteínas são retiradas por sucessivas lavagens.

A ligação é medida por uma reação que torna um substrato incolor em um produto colorido, a mudança de cor pode ser medida diretamente na placa onde ocorreu, facilitando a aquisição de dados. A marcação de anticorpos antiimunoglobulinas também pode ser detectada pelo ELISA, esta técnica é usada para detectar a ligação de um anticorpo a outros antígenos ligados à placa. Neste caso, o anticorpo antiimunoglobulina é usado em uma segunda camada, o uso

dessa segunda camada amplifica o sinal, já que pelo menos duas moléculas de anticorpo antiimunoglobulina são capazes de se ligar a cada anticorpo.

3.12.2 Procedimento para o Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Inicialmente foi preparada uma solução de veneno total (2 mg/mL) em solução tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6 para a sensibilização da placa.

Aplicaram-se 100 μ L por poço e a placa foi acondicionada em um envelope de polietileno juntamente com um algodão umedecido, permanecendo assim “overnight” em geladeira a 4° C.

Após sucessivas lavagens com PBST (Phosphate-buffered saline Tween) 0,15 M, possíveis sítios de ligação foram bloqueados com 1% de leite em pó dissolvido em PBS, por 1 hora à temperatura ambiente.

Seguindo a fase de lavagens acima citada, o anti-soro a ser testado foi diluído em duas concentrações 1/100 e 1/50 , adicionado à placa e incubado por 1 hora à 37° C. Novas lavagens foram feitas e o conjugado IgG de carneiro anti- IgG de camundongo marcado, com peroxidase da Sigma, com uma diluição de 1/1000 foi adicionado à placa e incubado novamente por 1 hora à 37° C.

Após as lavagens finais, o substrato cromógeno O-phenylenediamine-OPD (0,5mg/mL) em tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05M; pH 5,0) e H₂O₂ (30%), foi adicionado à placa e incubado por 20 minutos em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de ácido cítrico 0,2 M A absorvância foi verificada em leitor de microplacas da marca Dynatech® modelo MR - 4000, no comprimento de onda de 450 nm.

4. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados da cromatografia do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, repurificação das toxinas (crotoxina e crotamina), análise de ultravioleta das toxinas nativa e irradiada com e sem “scavenger”, análise de fluorescência das toxinas nativas e irradiadas, espectrometria de massa da crotamina nativa e irradiada, análise de atividade tóxica aguda (DL 50) da crotoxina nativa e irradiada com e sem “scavenger”, avaliação dos anticorpos produzidos por ELISA da crotoxina nativa e irradiada com 2000 Gy com e sem “scavenger”.

4.1 Obtenção das toxinas a partir do veneno total

A FIGURA 4 apresenta o perfil cromatográfico da purificação das toxinas a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. O Pico 1 representa a convulxina, pico 2, toxina que supostamente tem ação hemoconcentrante, pico 3, a giroxina, pico 4, a crotoxina e pico 5, a crotamina.

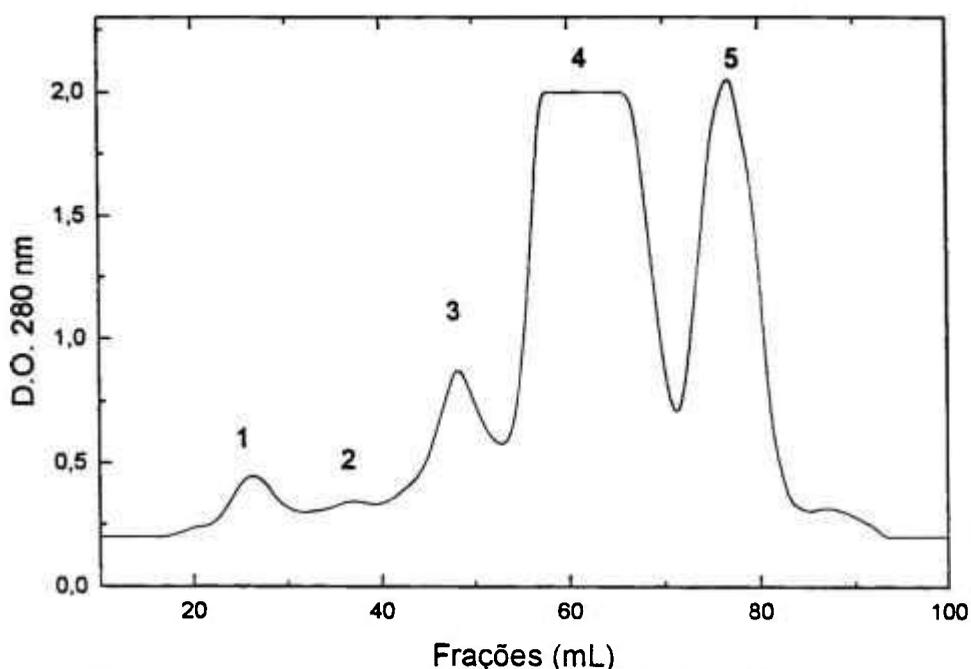


FIGURA 4. Cromatograma do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de exclusão molecular Superdex 75.

Na FIGURA 5 está apresentado o perfil cromatográfico da repurificação da crotoxina a partir do pico 4 da FIGURA 4 em coluna de troca iônica Mono Q, com gradiente linear de NaCl variando de 0 a 0,5 M.

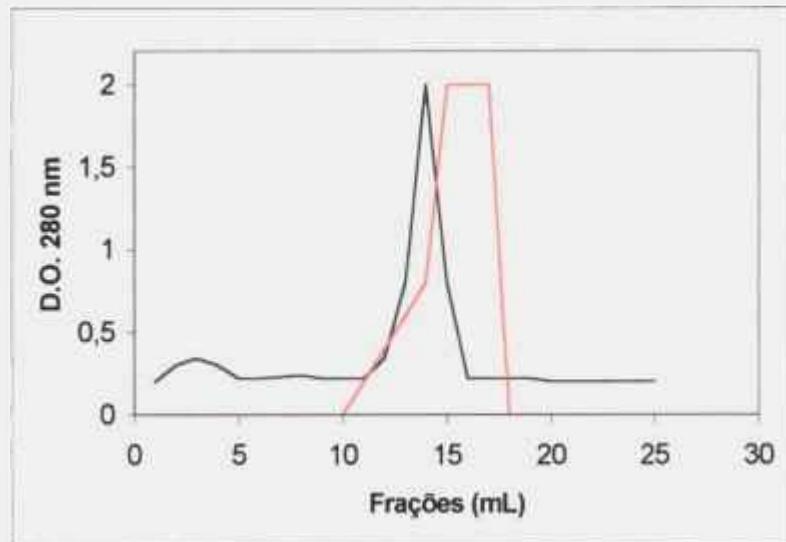


FIGURA 5. Recromatografia da crotoxina em resina Mono Q.

Na FIGURA 6 está apresentado o perfil da repurificação da crotamina (pico 5 FIGURA 4) em coluna do tipo Resource S, com gradiente linear de NaCl variando entre 0 e 2 M de NaCl.

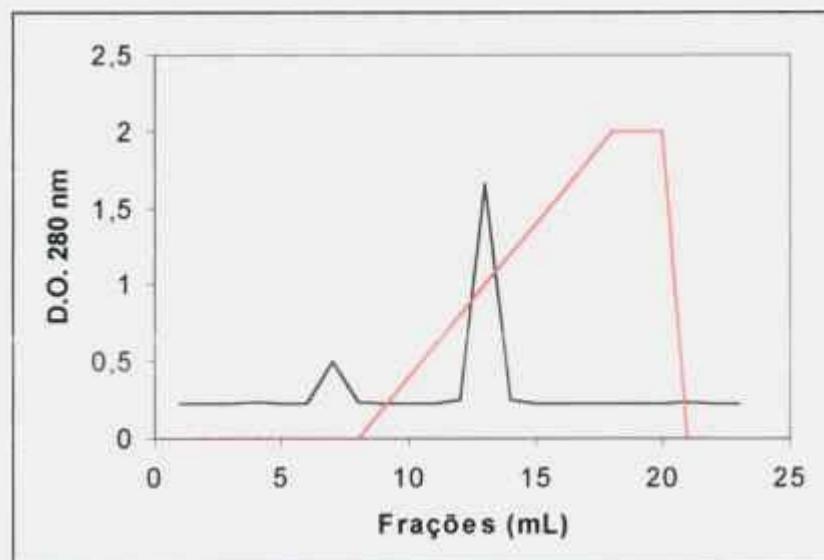


FIGURA 6. Recromatografia de crotamina em resina Resource S.

4.2 Absorção Ultravioleta

Na FIGURA 7 está apresentado o resultado da análise de absorção ultravioleta da crotoxina nativa sem "scavenger" e na presença de t-butanol e nitrato de sódio. Pode-se notar que a toxina na presença do nitrato de sódio sofre uma diminuição de absorção principalmente na região dos compostos aromáticos (280 nm).

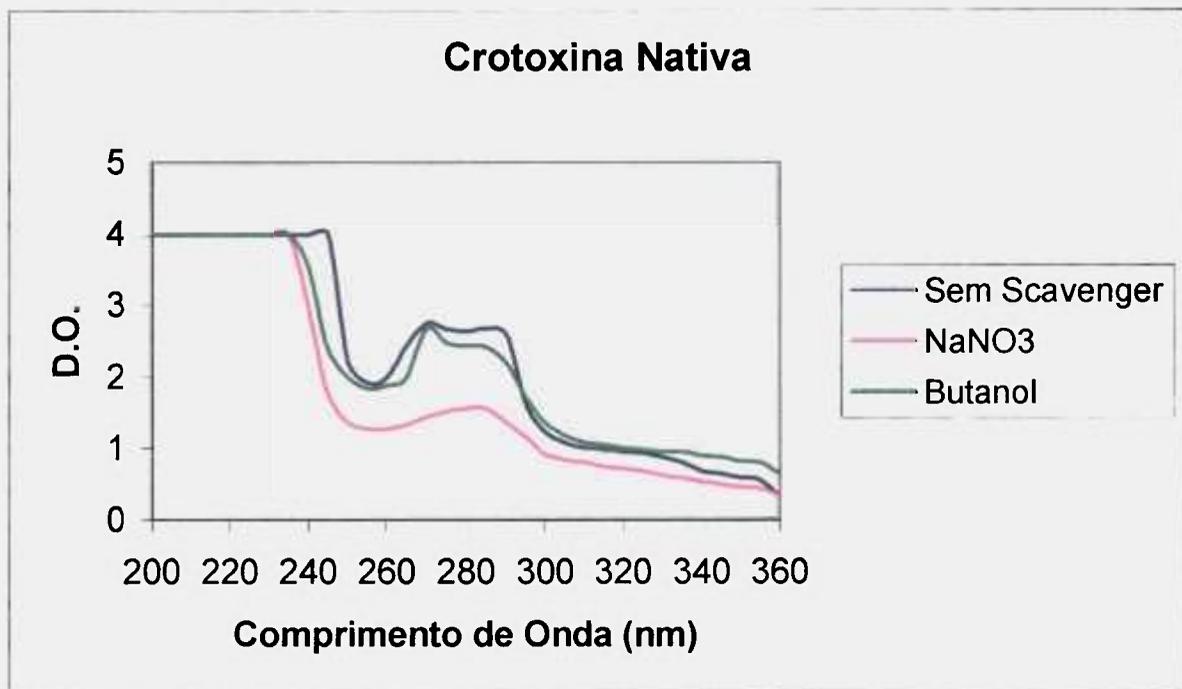


FIGURA 7. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotoxina nativa com e sem "scavenger".

Na FIGURA 8 apresenta-se o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 400 Gy na presença ou não de substâncias "scavenger". Observa-se que a toxina irradiada sem "scavenger" não apresenta alterações relevantes quando comparada com a toxina nativa também sem "scavenger". Quando as toxinas estão na presença dos "scavengers", a absorção é mantida, principalmente, na região das cadeias peptídicas (200 - 210 nm), nas demais regiões a absorção sofre um decréscimo.

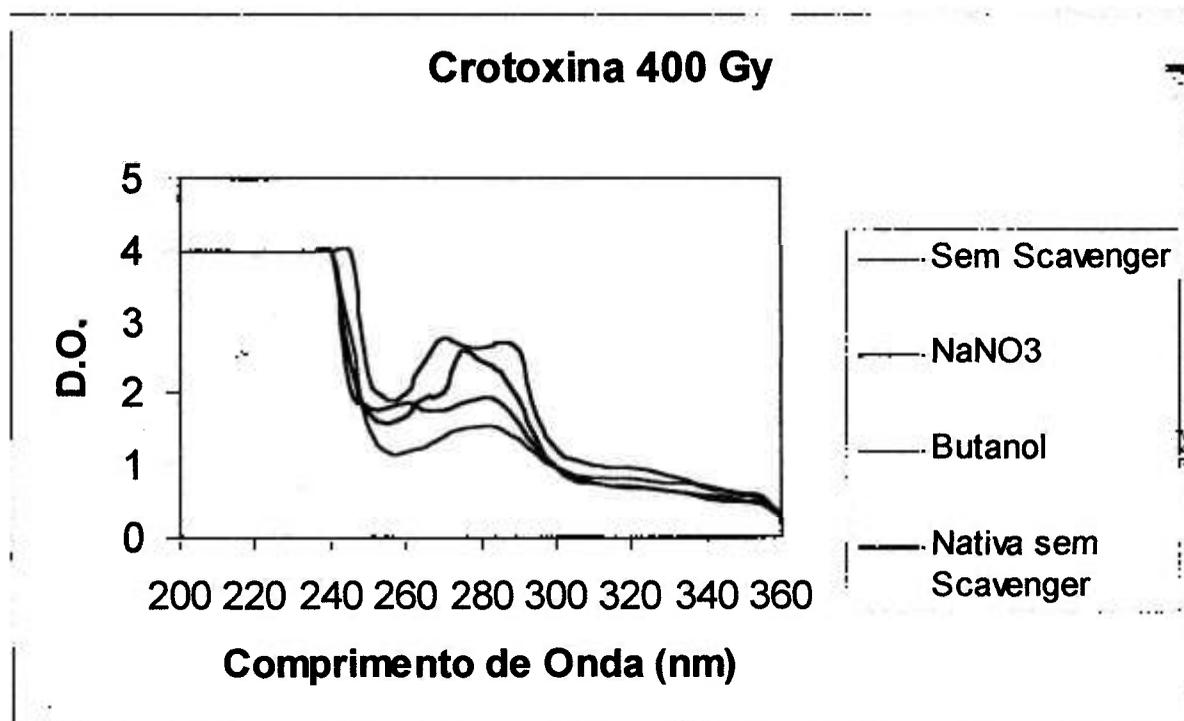


FIGURA 8. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 400 Gy na presença ou não de "scavenger".

Na FIGURA 9 apresenta-se o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 2000 Gy na presença ou não de substâncias "scavenger". Verifica-se que a toxina irradiada sem "scavenger" tem uma diminuição de absorção, enquanto para as toxinas com os "scavengers" nota-se um aumento da absorção.

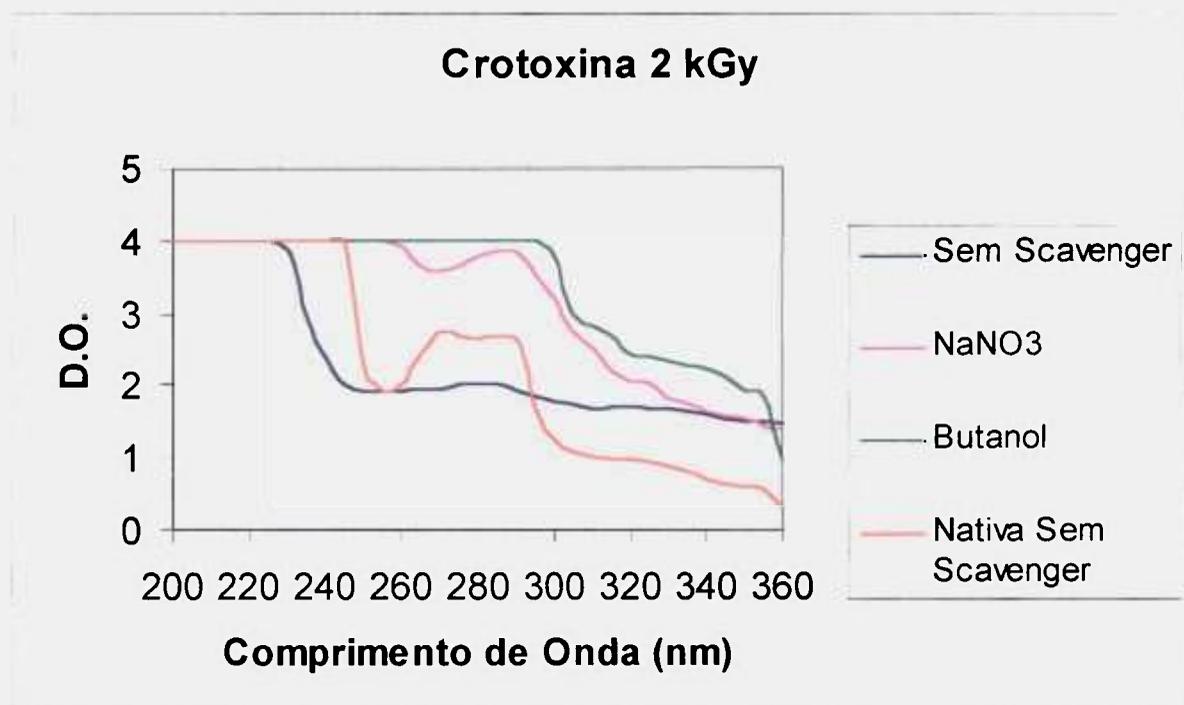


FIGURA 9. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 2000 Gy na presença ou não de "scavenger".

Na FIGURA 10 está apresentado o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 10000 Gy na presença ou não de substâncias "scavenger". Nota-se que a toxina na presença do t-butanol teve uma diminuição de absorção, já a toxina sem "scavenger" e com nitrato apresentam aumento na absorção.

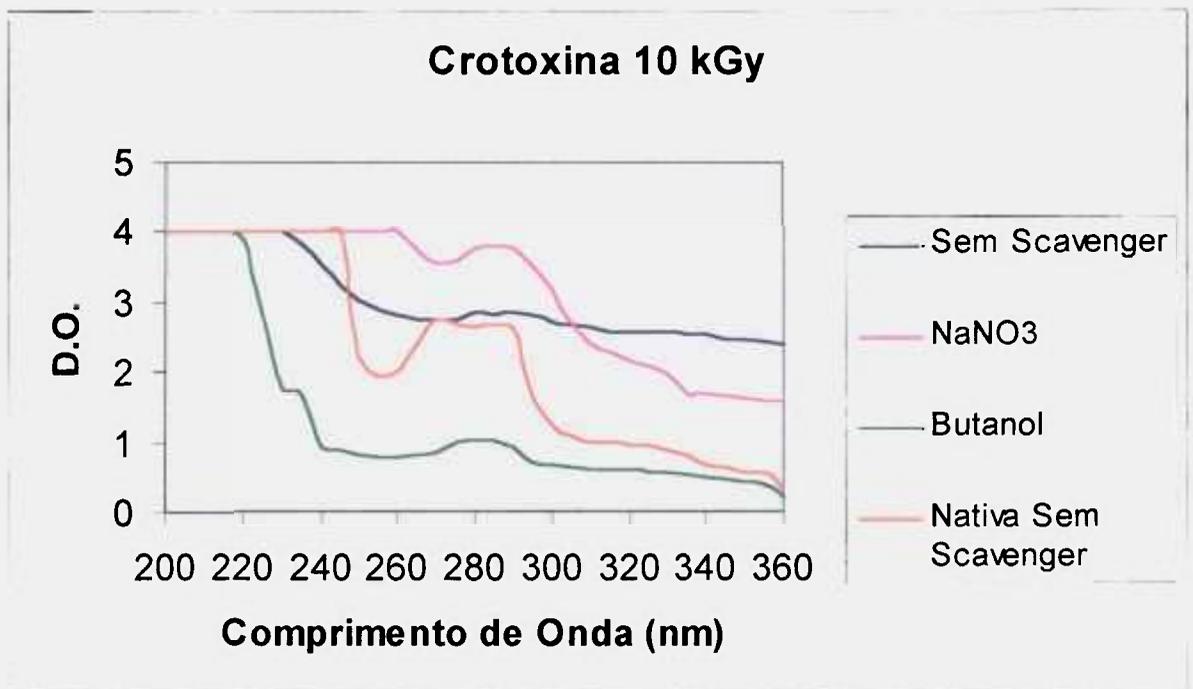


FIGURA 10. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotoxina nativa e irradiada com 10000 Gy na presença ou não de "scavenger".

Na FIGURA 11 está apresentado o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotamina nativa sem “scavenger” e na presença de t-butanol e nitrato de sódio. Pode-se verificar que a toxina na presença de ambos os “scavengers” sofrem diminuição de absorção em todas as regiões do espectro.

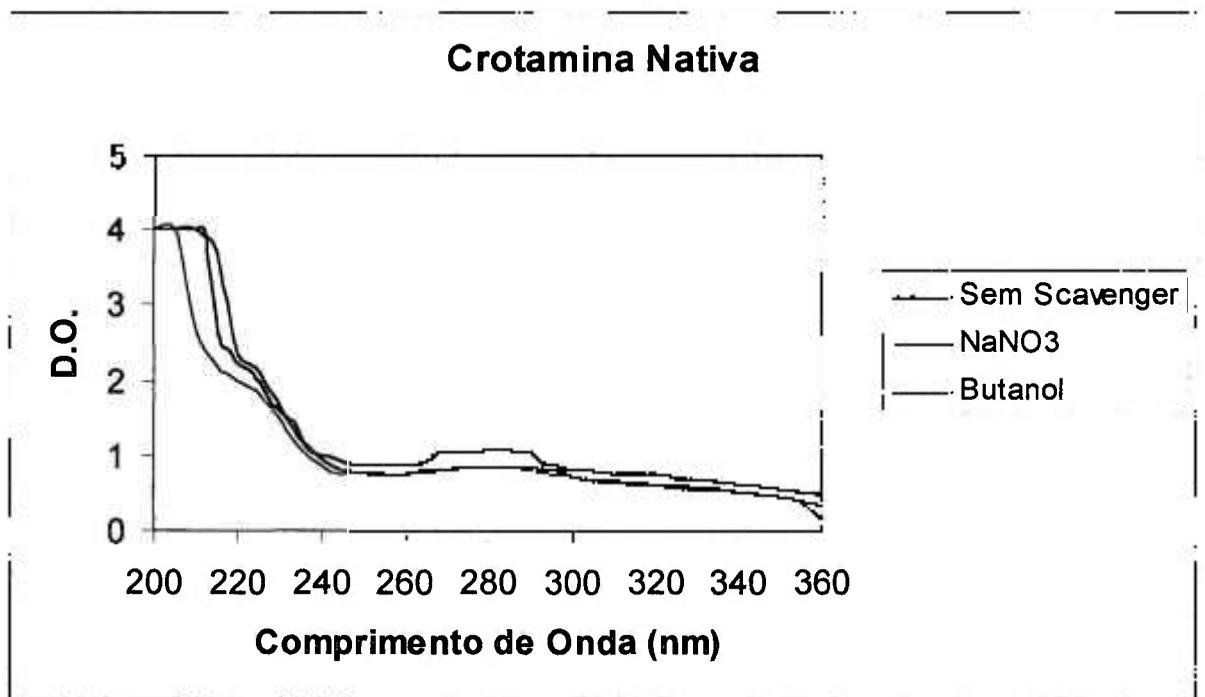


FIGURA 11. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotamina nativa com e sem “scavenger”.

Na FIGURA 12 está apresentado o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 400 Gy na presença ou não de substâncias “scavenger”. A crotamina irradiada sem os “scavengers” apresenta um aumento de absorção em todas as regiões, enquanto a toxina na presença dos “scavengers” tem um decréscimo de absorção.

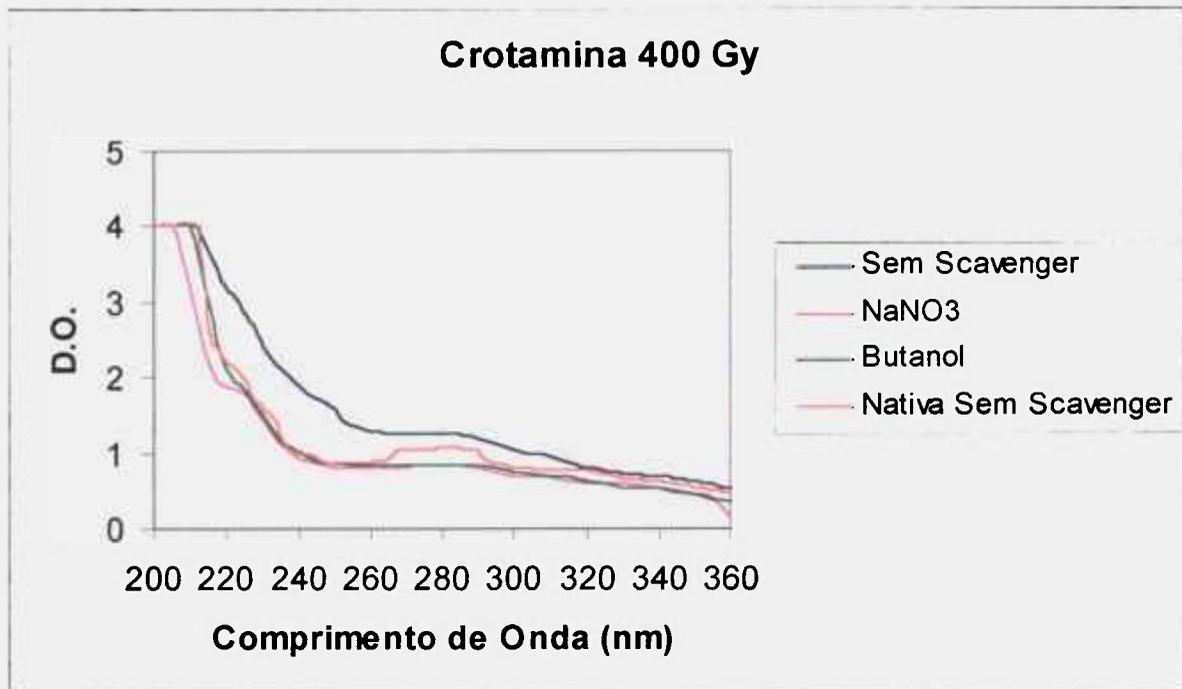


FIGURA 12. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 400 Gy na presença ou não de “scavenger”.

Na FIGURA 13 está apresentado o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 2000 Gy na presença ou não de substâncias “scavenger”. Verifica-se neste caso, que a toxina irradiada sem “scavenger” e com nitrato de sódio apresentam aumento de absorção, a toxina com t-butanol não apresenta alterações se comparada com a toxina nativa sem “scavenger”.

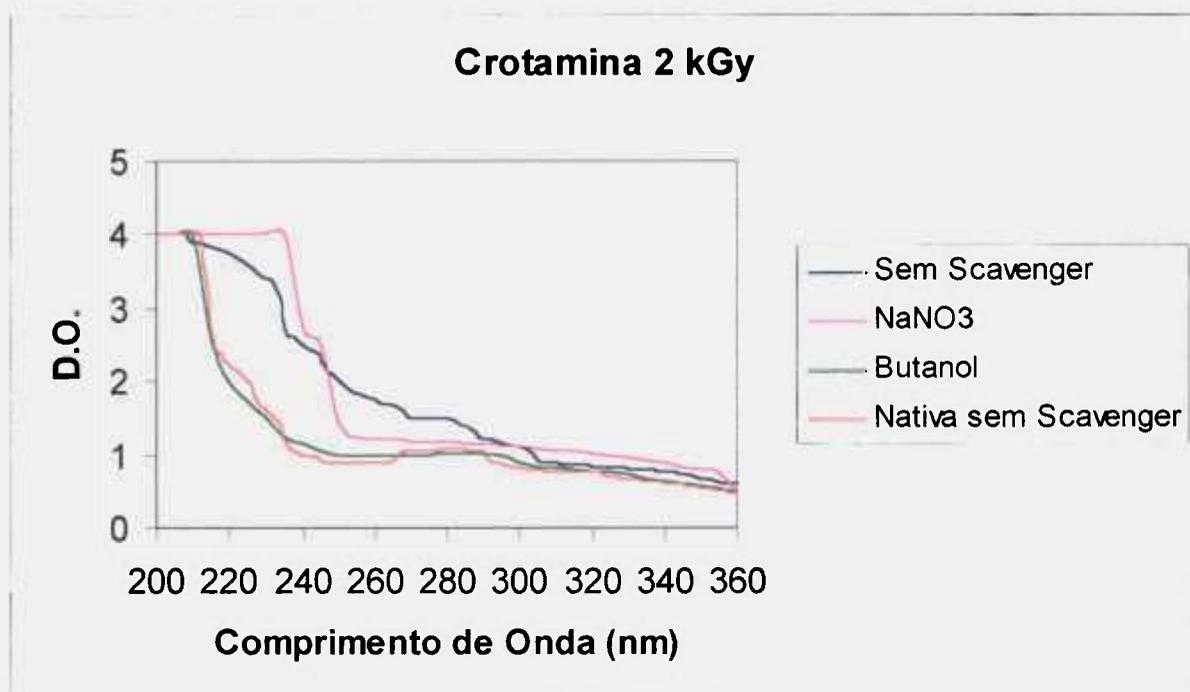


FIGURA 13. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 2000 Gy na presença ou não de “scavenger”.

Na FIGURA 14 está apresentado o resultado das análises de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 10000 Gy na presença ou não de substâncias "scavenger". A toxina sem "scavenger" e na presença do nitrato de sódio apresenta um discreto aumento de absorção e quando está em presença de t-butanol apresenta uma ligeira diminuição.

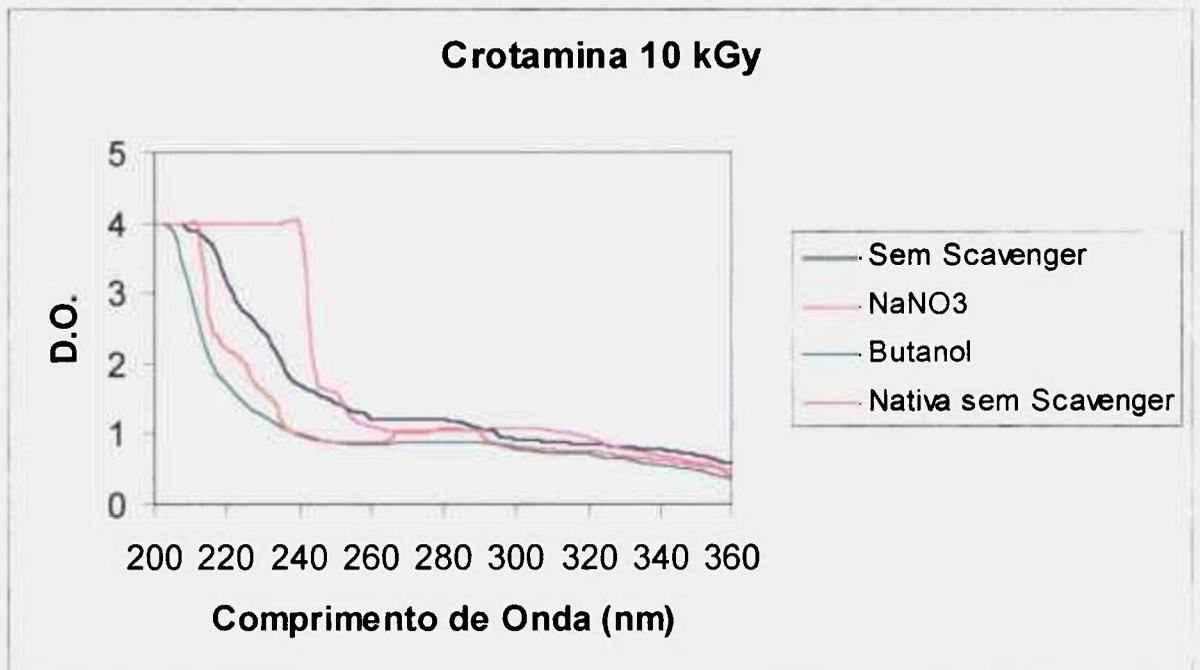


FIGURA 14. Resultado da análise de absorção ultravioleta da crotamina nativa e irradiada com 10000 Gy na presença ou não de "scavenger".

4.3 Análise de espectro de fluorescência

Na FIGURA 15 e 16 estão apresentados os resultados das análises de fluorescência da crotoxina nativa e irradiada com 400 Gy sem “scavenger”. Em todos os gráficos referentes a esta análise o primeiro pico representa a emissão de fluorescência do Raman da água (280 nm), sendo o pico de interesse, o do triptofano, localizado em 350 nm.

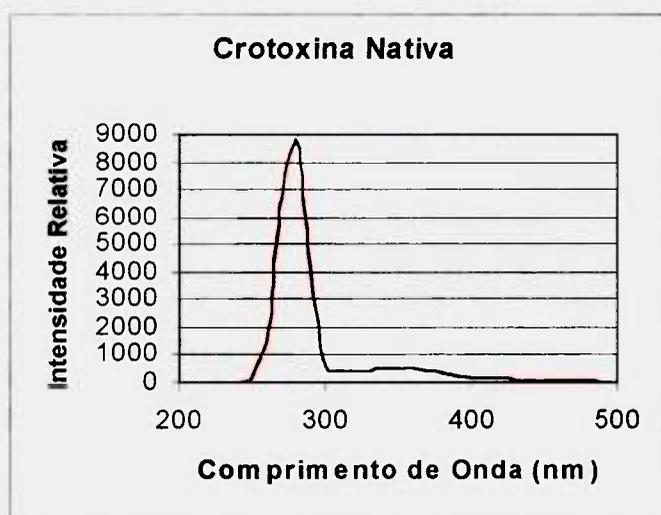


FIGURA 15. Resultado da análise de fluorescência da crotoxina nativa sem “scavenger”.

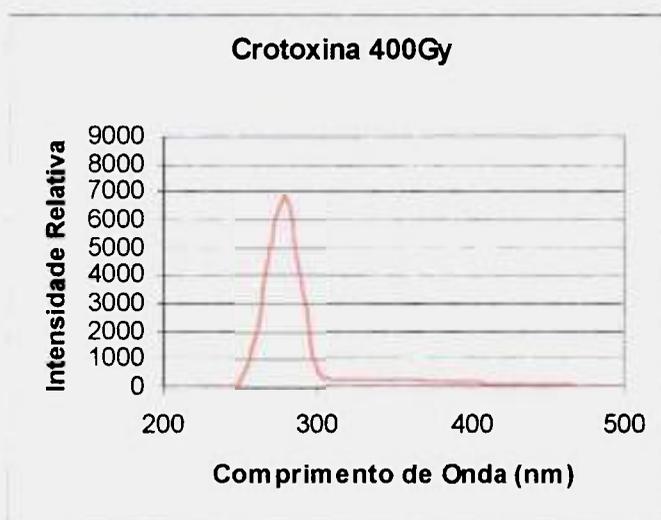


FIGURA 16. Resultado da análise de fluorescência da crotoxina irradiada com 400 Gy sem “scavenger”.

Na FIGURA 17 e 18 estão apresentados os resultados das análises de fluorescência da crotoxina irradiada com 2000 e 10000 Gy sem "scavenger".

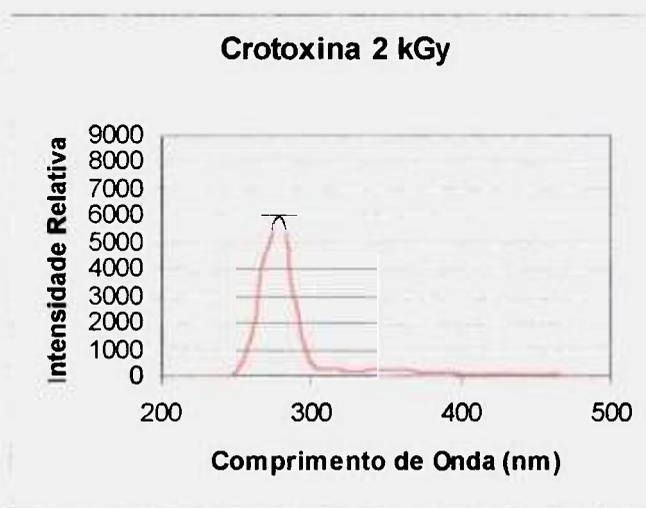


FIGURA 17. Resultado da análise de fluorescência da crotoxina irradiada com 2000 Gy sem "scavenger".

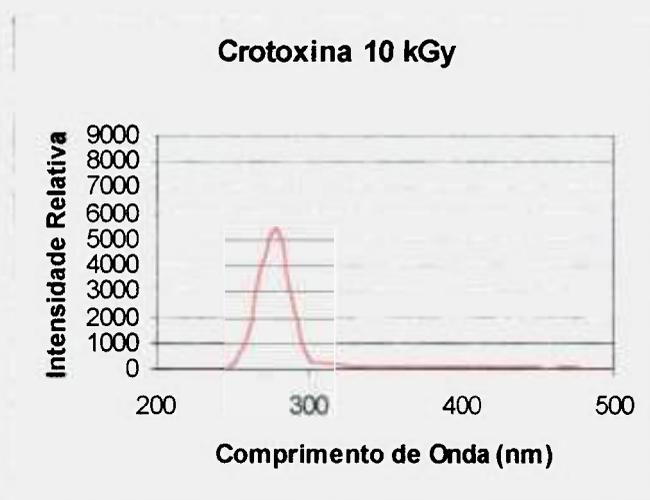


FIGURA 18. Resultado da análise de fluorescência da crotoxina irradiada com 10000 Gy sem "scavenger".

Na FIGURA 19 e 20 estão apresentados os resultados das análises de fluorescência da crotamina nativa e irradiada com 400Gy sem “scavenger”. Em todos os gráficos referentes a esta análise o primeiro pico representa a emissão de fluorescência do Raman da água (280 nm), sendo o pico de interesse, o do triptofano, localizado em 350 nm.

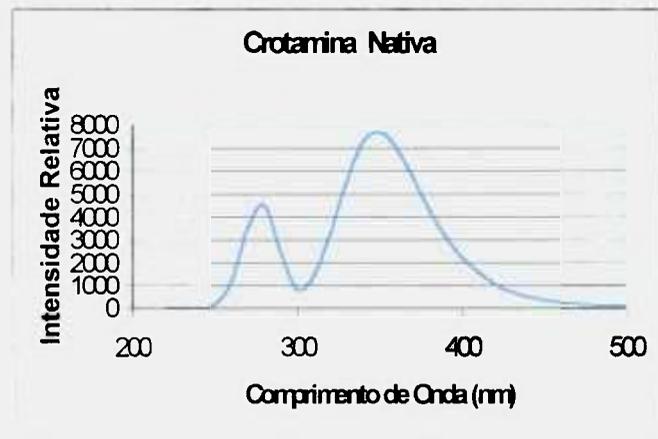


FIGURA 19. Resultado da análise de fluorescência da crotamina nativa sem “scavenger”.

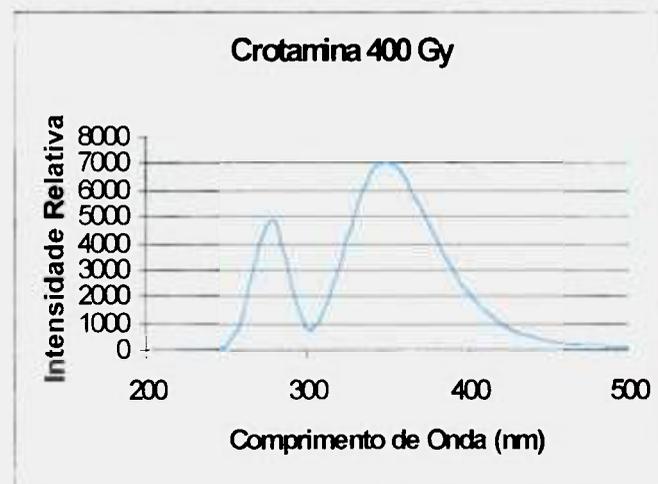


FIGURA 20. Resultado da análise de fluorescência da crotamina 400 Gy sem “scavenger”.

Na FIGURA 21 e 22 estão apresentados os resultados das análises de fluorescência da crotamina irradiada com 2000 e 10000 Gy sem “scavenger”.

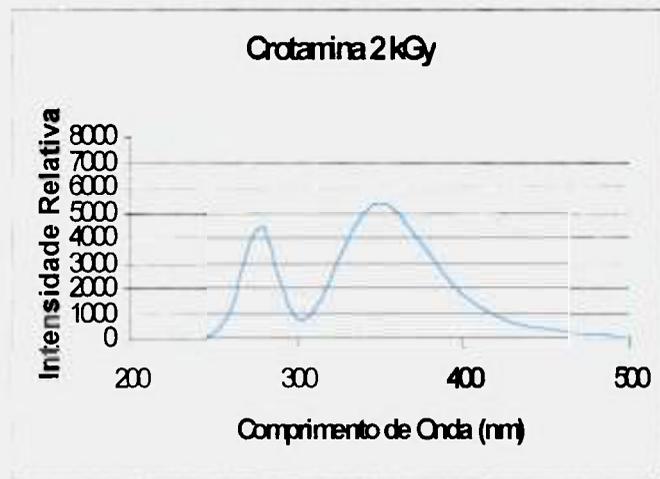


FIGURA 21. Resultado da análise de fluorescência da crotamina irradiada com 2000 Gy sem “scavenger”.

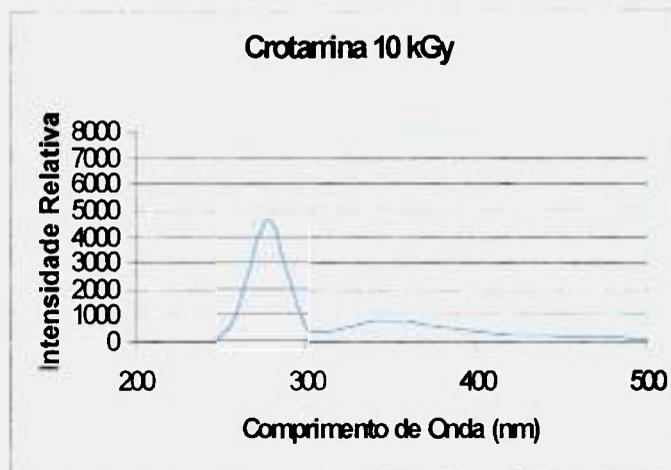


FIGURA 22. Resultado da análise de fluorescência da crotamina irradiada com 10000 Gy sem “scavenger”.

4.4 Análise por espectrometria de massa

Na FIGURA 23 está apresentado o resultado da análise da espectrometria de massa da crotamina nativa sem a presença de “scavenger”. Observa-se que há um pico majoritário referente a crotamina (4882,10 Da), os demais picos são ruídos provenientes do aparelho.

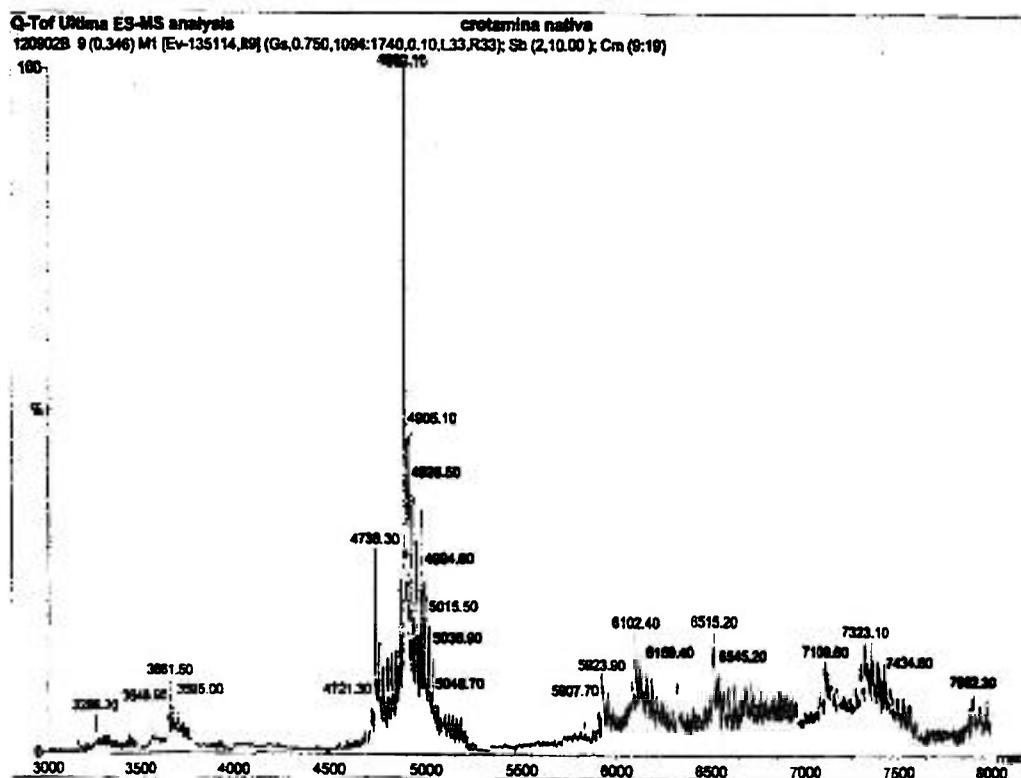


FIGURA 23. Resultado da análise da crotamina nativa por espectrometria de massa sem “scavenger”.

Na FIGURA 24 está apresentado o resultado da análise da espectrometria de massa da crotamina irradiada com 400 Gy sem a presença de “scavenger”.

Nota-se o pico de maior intensidade (4881,70 Da) referente a crotamina.

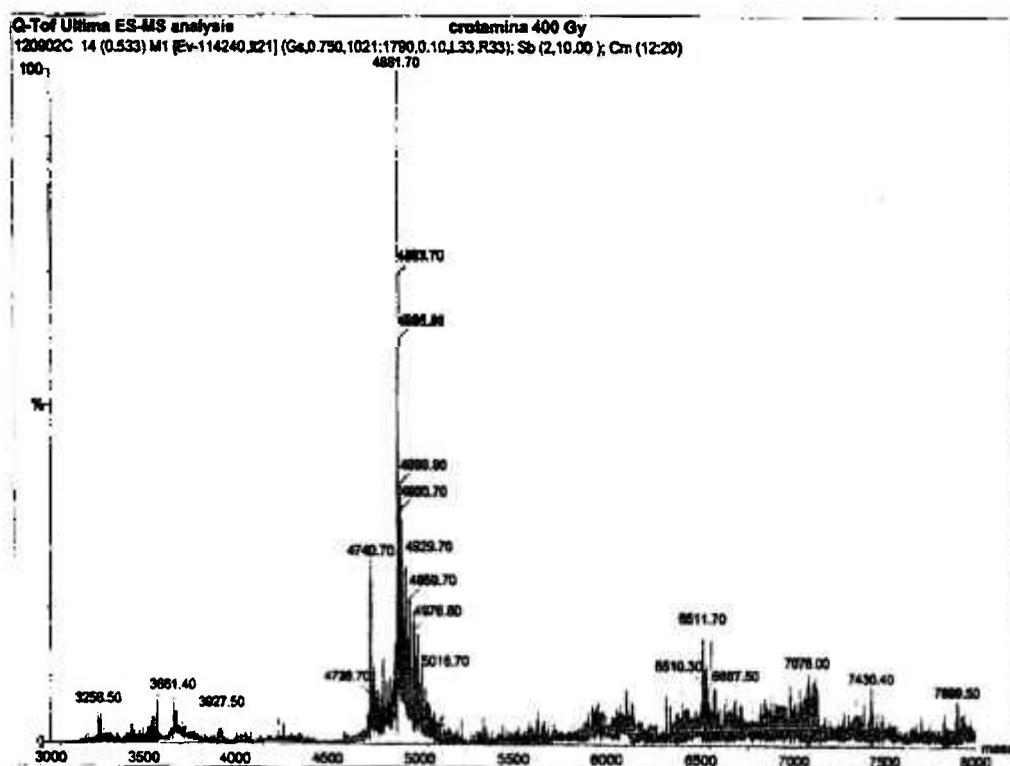


FIGURA 24. Resultado da análise da crotamina irradiada com 400 Gy por espectrometria de massa sem “scavenger”.

Na FIGURA 25 está apresentado o resultado da análise da espectrometria de massa da crotamina irradiada com 2000 Gy sem a presença de "scavenger". Verifica-se a presença do pico majoritário em 4882,90 Da e picos com maior massa como: 9769,90 Da que pode ser um dímero.

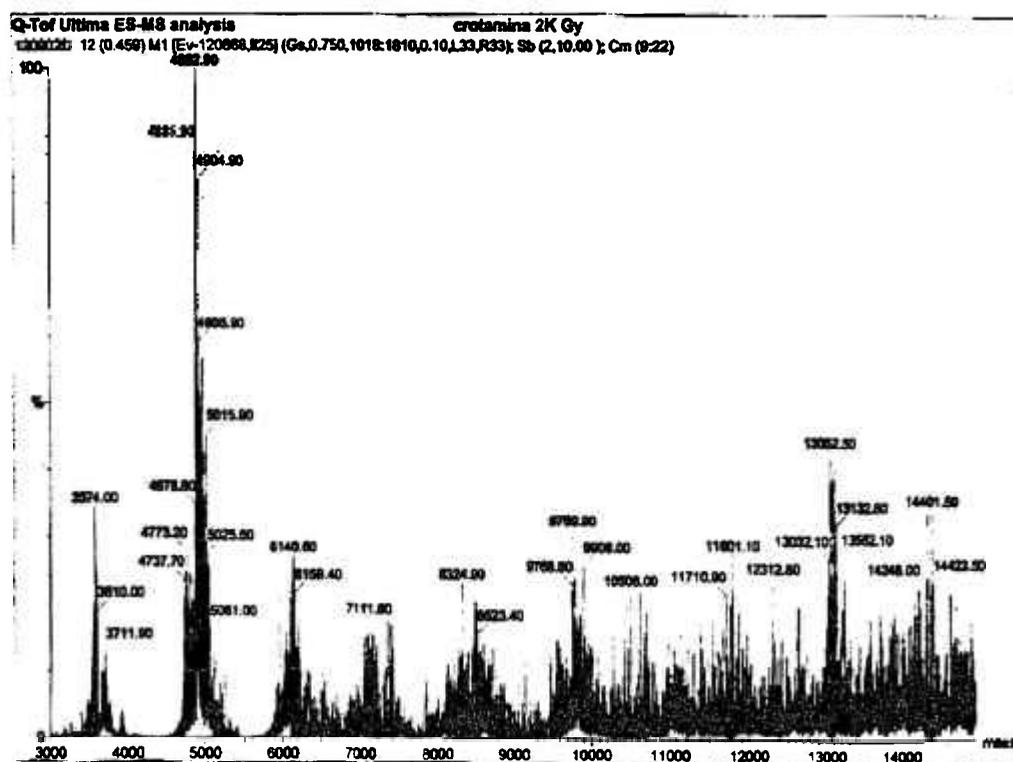


FIGURA 25. Resultado da análise da crotamina irradiada com 2000 Gy por espectrometria de massa sem "scavenger".

Na FIGURA 26 está apresentado o resultado da análise da espectrometria de massa da crotamina irradiada com 10000 Gy sem a presença de “scavenger”. Observam-se diversos picos com massas moleculares tanto maiores como menores do que a crotamina.

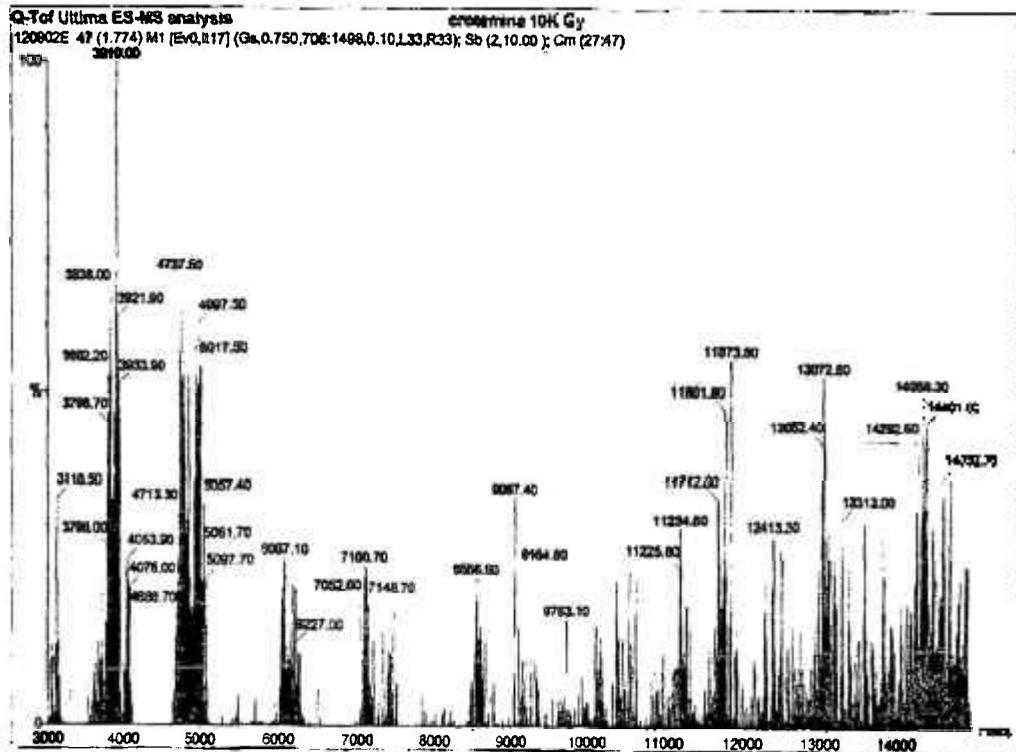


FIGURA 26. Resultado da análise da crotamina irradiada com 10000 Gy por espectrometria de massa sem “scavenger”.

4.5 Atividade enzimática

Na FIGURA 27 estão apresentados os resultados da análise da atividade fosfolipásica da crotoxina nativa e irradiada na presença e na ausência de substância "scavenger". Verifica-se que há uma diminuição da atividade conforme o aumento da dose. Pode-se notar ainda que a atividade enzimática quando a toxina está na presença de t-butanol tem uma diminuição menor quando comparada com a toxina com nitrato de sódio.

Cabe ressaltar que as análises foram realizadas em triplicata e os desvios padrões da médias foram inferiores a 5×10^{-3} .

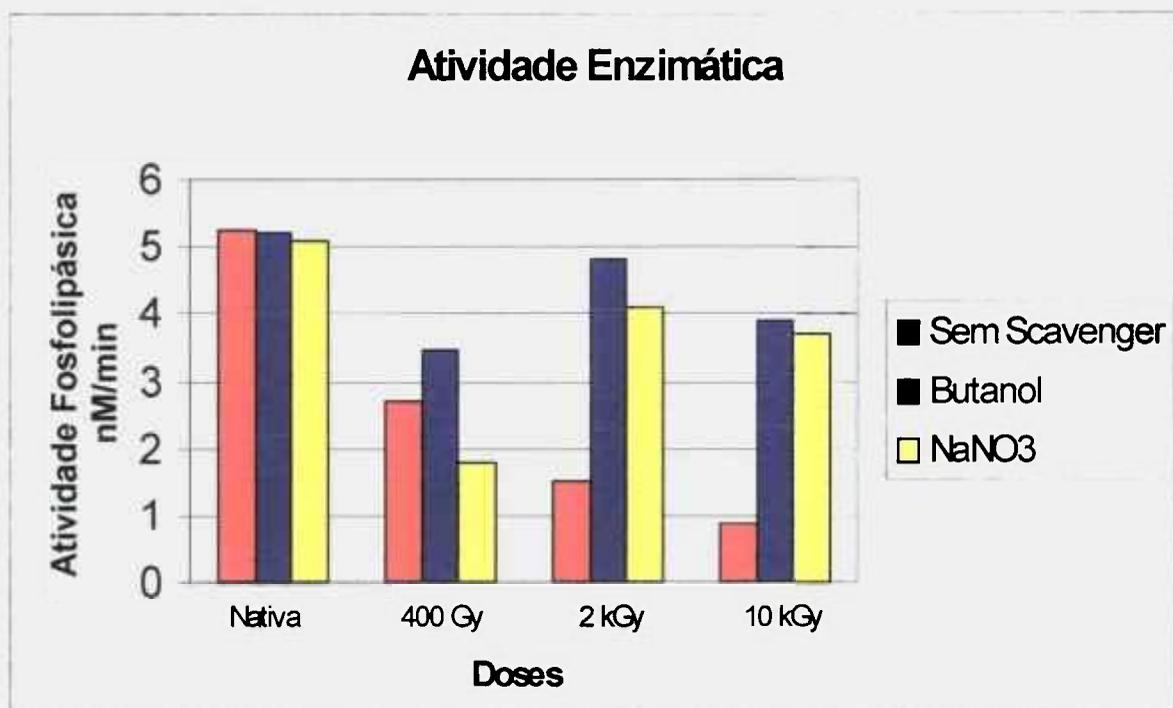


FIGURA 27. Análise de atividade enzimática da crotoxina nativa e irradiada com e sem "scavenger".

4.6 Atividade tóxica

Na FIGURA 28, está apresentado o resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada na presença ou na ausência das substâncias “scavengers”. A dose inoculada foi referente a 1DL50. Observa-se que apenas a toxina nativa sem “scavenger” e na presença de t-butanol apresentam mortalidade de 50% dos animais.

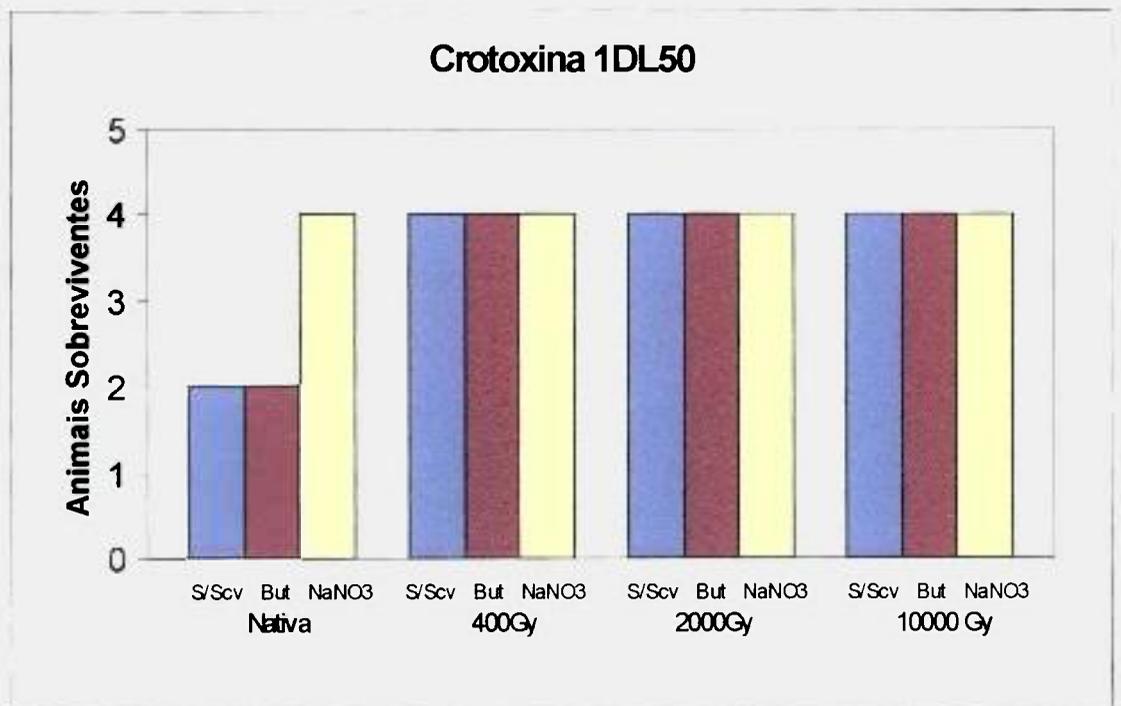


FIGURA 28. Resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada, com e sem “scavenger”, quando inoculado 1DL50.

Na FIGURA 29 está apresentado o resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada na presença ou na ausência das substâncias “scavengers”. A dose inoculada foi referente a 5DL50. Nota-se que a mortalidade dos animais para a toxina nativa sem “scavenger” apresentam mortalidade total dos animais. Quando a toxina foi irradiada com 400 Gy a mortalidade de 50% para a toxina nativa sem “scavenger” e na presença de t-butanol. Nas demais doses não há mortalidade.

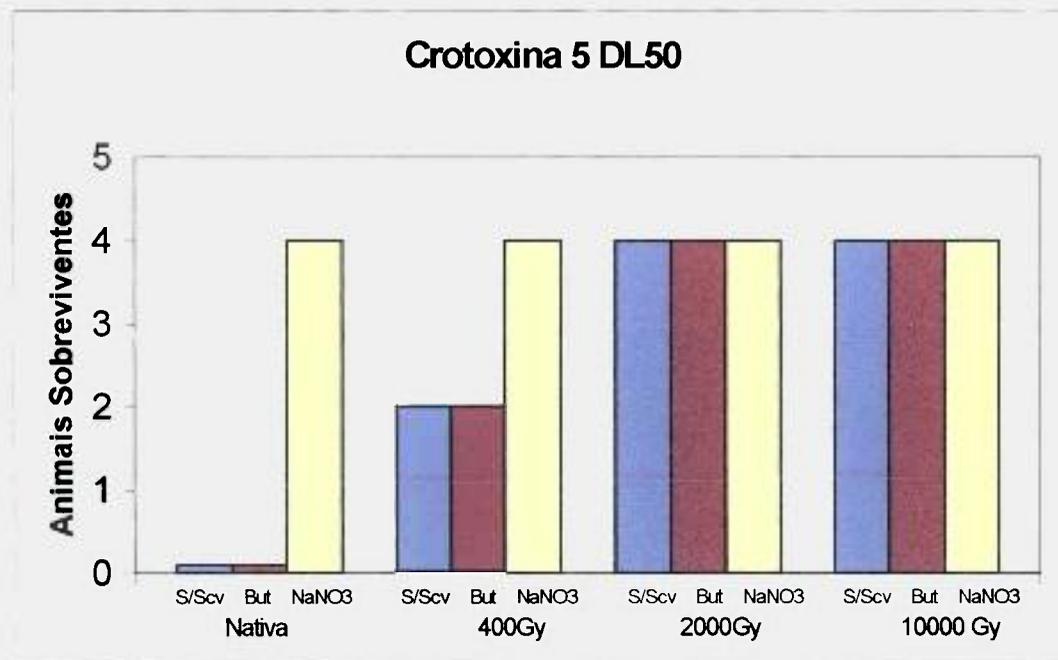


FIGURA 29. Resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada, com e sem “scavenger”, quando inoculado 5 DL50.

Na FIGURA 30 está apresentado o resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada na presença ou na ausência das substâncias “scavengers”. A dose inoculada foi referente a 10 DL50. Observa-se mortalidade total dos animais para a toxina nativa e irradiada com 400 Gy ,sem “scavenger” e na presença de t-butanol. Nas demais doses de irradiação não verifica-se mortalidade.

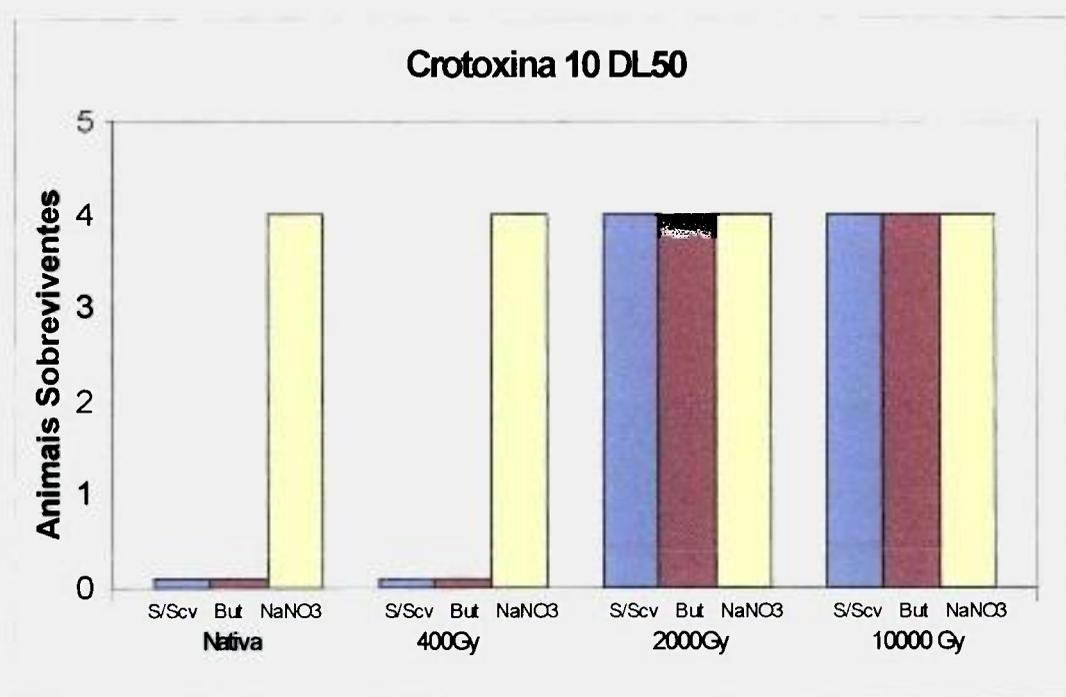


FIGURA 30. Resultado da atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada, com e sem “scavenger”, quando inoculado 10 DL50.

4.7 Produção de anticorpos

Na FIGURA 31 apresentam-se os resultados da análise de produção de anticorpos induzidos pela crotoxina nativa e irradiada com 2000 Gy na presença ou ausência de substância "scavenger". Observa-se uma resposta bastante heterogênea para a toxina nativa. Para a toxina irradiada na presença de t-butanol nota-se que há uma diminuição da resposta com relação a toxina irradiada. Pode-se verificar ainda uma semelhança entre as respostas apresentadas para toxina irradiada sem "scavenger" e na presença de nitrato de sódio.

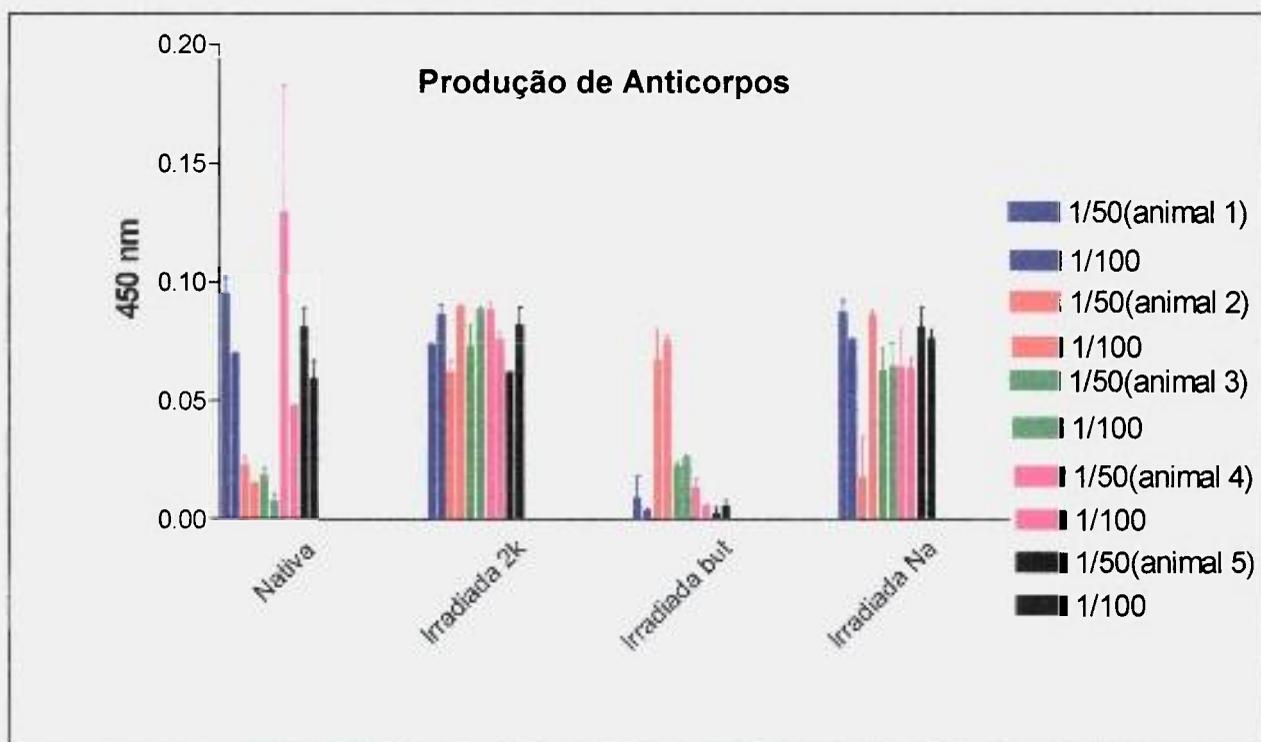


FIGURA 31. Análise de produção de anticorpos da crotoxina nativa e irradiada (2000 Gy) com ou sem "scavenger".

5. DISCUSSÃO

A separação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi feita por meio da cromatografia de exclusão molecular em gel Superdex 75 (FIG. 4). Este fracionamento baseia-se no tamanho das moléculas dos componentes, onde as moléculas maiores saem primeiro, já que esse gel é composto por esferas de tamanhos variados. Essas esferas contêm porosidades, as quais, permitem apenas a passagem de moléculas pequenas, com isso essas moléculas levam um tempo maior para sair. Esta pré-separação gerou 5 picos onde o primeiro refere-se a convulxina, o segundo uma toxina hemoconcentrante, o terceiro a giroxina, o quarto a crotoxina e o quinto a crotamina (CLISSA, 1997). Observando a FIGURA 4 nota-se que a crotoxina e a crotamina foram as toxinas que apresentaram as maiores áreas respectivamente.

Realizou-se então uma segunda etapa de purificação para obtenção das toxinas com alto grau de homogeneidade. Para a crotoxina utilizou-se uma resina de troca iônica do tipo MonoQ. Na FIGURA 5 observa-se um pico majoritário que é o referente a crotoxina (NASCIMENTO, 1995). No caso da crotamina utilizou-se uma resina de troca iônica do tipo Resource S e na FIGURA 6 também pode-se notar um pico de maior intensidade o qual se refere a crotamina (TENÓ *et al.*, 1990 e MITAKE, 2000).

As toxinas nativas e após a irradiação, na presença ou não de "scavengers", foram então analisadas por algumas técnicas físico-químicas para verificação das possíveis alterações nas moléculas causadas pela radiação.

Uma destas técnicas utilizadas foi a absorção ultravioleta. No caso das proteínas três regiões são importantes. As regiões acima de 280nm são relativas a cadeia lateral de alguns aminoácidos, a região entre 280 e 210 nm concentra os

aminoácidos aromáticos e a região abaixo de 210 nm concentram ligações peptídicas e outros aminoácidos não aromáticos (JAFJE & ORCHIN, 1962).

Sendo assim, na FIGURA 7 pode-se notar que na região das ligações peptídicas não há modificações relevantes para a crotoxina nativa, na presença de t-butanol e nitrato de sódio, já na região dos aminoácidos aromáticos nota-se diminuição de exposição dos cromóforos para o nitrato de sódio, indicando que apenas em razão da presença do nitrato de sódio já há alterações conformacionais na molécula.

Para a crotoxina irradiada com 400 Gy (FIGURA 8), observa-se um comportamento semelhante em todas as regiões, quando está na sua forma nativa e mesmo após a irradiação sem a presença dos "scavengers". Quando irradiada na presença de t-butanol e nitrato de sódio verifica-se uma diminuição da exposição dos cromóforos com relação a toxina nativa sem "scavenger", porém quando comparada com a toxina nativa, na presença dos "scavengers", a alteração de perfil é discreta.

Com a dose de radiação de 2000 Gy (FIGURA 9), pode ser verificado um aumento de exposição dos cromóforos em todas as regiões, quando comparada com a toxina nativa, tanto para a toxina em presença de t-butanol como também quando em presença de nitrato de sódio. Isto pode sugerir alterações em estrutura terciária da proteína. Quando a toxina está sem os "scavengers" nota-se uma diminuição de exposição sugerindo a degradação da proteína.

Quando a crotoxina foi irradiada com 10000 Gy (FIGURA 10) houve uma maior absorção tanto quando a toxina foi irradiada sem "scavenger" quanto na presença de nitrato de sódio. No caso do butanol houve uma diminuição da absorção, porém na região dos aminoácidos aromáticos (280 nm) verifica-se uma

dada quantidade de absorção, indicando que os aromáticos não estão todos voltados para a parte interna da molécula.

Na FIGURA 11, que se refere à crotamina nativa com e sem os "scavengers", na região das ligações peptídicas nota-se uma pequena diminuição de absorção quando a toxina está com nitrato de sódio, nas demais regiões nota-se ainda pequena diminuição para a toxina com ambos os "scavengers". Isso sugere que a molécula de crotamina é um pouco mais resistente quando exposto às substâncias "scavengers" quando comparada à crotoxina.

Para a crotamina irradiada com 400 Gy (FIGURA 12), verifica-se que o comportamento praticamente não muda quando a toxina nativa com "scavenger" é comparada com a toxina sem os "scavengers". Por outro lado, a toxina irradiada, sem nitrato de sódio e t-butanol, verifica-se uma maior absorção o que indica uma maior exposição dos cromóforos e conseqüentemente alterações de estrutura terciária.

Com a dose de 2000 Gy (FIGURA 13), quando a toxina está em presença de nitrato de sódio pode-se notar que há um ligeiro aumento da absorção na região das cadeias polipeptídicas e também na região dos aromáticos indicando mudanças de conformação na molécula, diferentemente do que se observa quando a toxina está na presença t-butanol onde não se observa diferença significativa.

Quando a crotamina foi irradiada com 10000 Gy (FIGURA 14), nota-se um ligeiro aumento da absorção, em todas as regiões, quando a toxina está na presença de nitrato de sódio e ligeira diminuição quando está na presença de t-butanol.

Comparando-se o comportamento entre as duas toxinas, constata-se que a crotoxina é significativamente mais vulnerável tanto à radiação quanto à presença das substâncias "scavengers". Isto pode ocorrer em razão da crotamina possuir uma forma mais compacta devido a presença de 7 pontes dissulfeto e também de ser um monômero, diferentemente da crotoxina que tem a forma dimérica, formadas pelas suas sub-unidades (crotapotina e fosfolipase A₂).

As FIGURAS 15, 16, 17 e 18 apresentam os resultados da análise de fluorescência da crotoxina nativa e irradiada nas três doses (400, 2000 e 10000 Gy) na ausência "scavenger", e permitem verificar as alterações conformacionais, principalmente do aminoácido triptofano (CHEN *et al.*, 1969). Examinando as figuras nota-se que a fluorescência da toxina é dose-dependente, diminuindo conforme o aumento da dose. Isso mostra que quanto maior a dose de radiação maior a exposição dos aminoácidos ao solvente, diminuindo assim a emissão de fluorescência.

Nas FIGURAS 19, 20, 21 e 22 estão apresentadas as análises de fluorescência da crotamina nativa e irradiada nas três doses (400, 2000 e 10000 Gy). Ao observar as figuras verifica-se que, também no caso da crotamina, o rendimento quântico é dose-dependente. Esses dados corroboram os dados de MOON & SONG (2001), que analisaram o comportamento da ovalbumina e ovomucoide irradiada com várias doses (500, 1000, 5000 e 10000 Gy) e também observaram um decréscimo dose-dependente da fluorescência.

Cabe ressaltar que na comparação entre as duas toxinas, a crotamina apresenta um rendimento quântico muito superior em relação a crotoxina, porém isso não indica que a crotamina tenha mais aminoácidos aromáticos do que a

crotoxina, isso deve ser um indicativo de que os aminoácidos da crotamina estão menos expostos às moléculas de solvente do que no caso da crotoxina.

As amostras de crotoxina e de crotamina nativas e irradiadas, na presença dos “scavengers”, também foram analisadas, porém não mostraram respostas significativas. No caso do t-butanol as amostras sofreram supressão (quenching) do solvente. Entretanto, quando as amostras estão na presença de nitrato de sódio, não há relato na literatura de supressão de íons nitrato ou até mesmo de íons sódio, contudo, GUILBALT (1990), destaca o poder de supressão dos compostos oxigenados, que afetam severamente os grupamentos aromáticos. Sugere-se então que pode ter ocorrido este fenômeno no caso das análises em nitrato de sódio.

Na FIGURA 23 está apresentada a análise de espectrometria de massa da crotamina nativa, nota-se que há um pico de massa 4882,10 Da que é a massa da crotamina. Verifica-se que há também alguns ruídos no espectro, porém não são significativos.

Na FIGURA 24 está o espectro de massa da crotamina irradiada com 400 Gy, pela análise da figura pode-se observar que pode estar começando haver alguma mudança de ordem estrutural na molécula, mas sem grande significado.

Na FIGURA 25 está o espectro da crotamina irradiada com 2000 Gy, onde pode-se observar um espectro um pouco mais complexo, tendo a formação de dímeros de massa 9769,90, mas o pico principal cuja massa é de 4882 ainda permanece.

Na FIGURA 26 está o espectro da crotamina irradiada com 10000 Gy e este demonstra que há extinção do pico de massa característico da crotamina (4882 Da) e há formação de moléculas mais complexas, ou seja a formação de

dímeros ou até trímeros corroborando os achados de HAMPE (1990) que relata que quando a crotamina é submetida a determinadas condições pode haver a formação de oligômeros, já que esses são ligados por ligações covalentes.

A análise de espectro de massa pode ser realizado em um espectrômetro de massa que tem uma outra forma de ionizar as amostras. Esse sistema é denominado MALDI. Neste caso utiliza-se uma energia proveniente de um laser gerado por um potencial elétrico para ionizar as moléculas. Para esse método de ionização as amostras a serem analisadas devem estar contidas em uma matriz cristalizada. A ionização ocorre quando as moléculas da matriz absorvem energia do laser. A liberação desta energia causa uma rápida expansão térmica da matriz e o analíto é levado à fase gasosa (LIN *et al.*, 2003), contudo no caso deste trabalho não haveria diferença nos resultados, já que a única diferença entre os equipamentos utilizados é a forma de ionização da amostra.

A atividade enzimática da crotoxina nativa e após a irradiação, na presença ou não de substâncias "scavengers", está apresentada na FIGURA 27, onde verifica-se que a atividade enzimática da toxina, sem a presença dos "scavengers", diminui de acordo com o aumento da dose de radiação. Quando se analisa a toxina em sua forma nativa na presença dos "scavengers", a atividade enzimática não é alterada significativamente. Quando à toxina foi submetida à dose de 400 Gy de irradiação, a atividade teve um decréscimo tanto para toxina com ou sem "scavengers". Para a dose de 2000 Gy nota-se diminuição da atividade quando comparada com as amostras nativas. Com a dose de 10000 Gy a atividade também diminuiu. Em todas as doses de radiação pode-se verificar que os "scavengers" exercem um certo tipo de proteção à molécula impedindo

que a atividade seja extinta, especialmente para a dose de 2000 Gy quando está na presença de t-butanol.

A atividade tóxica da crotoxina nativa e irradiada, com três doses, foi verificada por meio de análise de dose letal 50%. Quando se utilizou a dose correspondente a 1DL 50 (0,06 µg/g de animal) (FIGURA 28), houve mortalidade de animais apenas para a toxina nativa sem "scavenger" e com o t-butanol. No caso das toxinas irradiadas não houve mortalidade, indicando assim perda da atividade tóxica após a irradiação. Para uma quantidade equivalente a 5 DL50 (0,30µg/g de animal) (FIGURA 29), houve mortalidade total dos animais nos casos das toxinas nativas, sem "scavenger" e com t-butanol. Quando irradiada com 400 Gy a mortalidade também foi igual para a toxina sem "scavenger" e com t-butanol, por outro lado na presença de nitrato de sódio todos os animais sobreviveram, sugerindo que os elétrons aquosos não estão diretamente relacionados com a perda da toxicidade da toxina. Nas demais doses de radiação (2000 e 10000 Gy) não houve mortalidade.

Quando foi usada uma quantidade relativa a 10 DL50 (0,60 µg/g de animal) (FIGURA 30) a mortalidade dos animais foi total tanto para a toxina nativa quanto para a toxina irradiada com 400 Gy, sem "scavenger" e com t-butanol. Nas demais doses de radiação não houve mortalidade confirmando então a perda da atividade tóxica da toxina (ANDRIANI, 1995; BARIDE *et al.*, 1980; CLISSA, 1997; MURATA, 1988; NASCIMENTO *et al.*, 1996).

A produção de anticorpos foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) para a crotoxina nativa e irradiadas nas doses anteriormente citadas, com e sem "scavenger". Os resultados desta análise indicam que quando a toxina é irradiada, a diferença na produção de anticorpos não é relevante para as doses de 400 Gy e

10000 Gy. Entretanto para a dose de 2000 Gy, com e sem "scavenger", os resultados se mostraram relevantes (ANDRIANI, 1995; CLISSA, 1997; NASCIMENTO, 1995 e NASCIMENTO *et al.*, 1996). Pode-se observar na FIGURA 31 que a toxina nativa na ausência dos "scavenger" produz uma resposta imunológica heterogênea, Por outro lado a toxina quando estava irradiada na dose de 2000 Gy apresentou repostas mais homogêneas quando comparada com a toxina nativa sem "scavenger". Verifica-se que quando a toxina irradiada está na presença de t-butanol as repostas são drasticamente diminuídas. Ao contrário do que se observa para as toxinas em presença de nitrato de sódio cujas repostas estão semelhantes àquelas produzidas para as toxinas irradiadas sem "scavenger". Isso leva a sugestão de que realmente o radical hidroxila está diretamente relacionado com a produção dos anticorpos e por conseguinte agindo nas propriedades imunogênicas da toxina.

6. CONCLUSÕES

- O protocolo empregado para o isolamento das frações resultou em toxinas altamente purificadas.
- As substâncias utilizadas como "scavengers" (t-butanol e nitrato de sódio) demonstraram ser eficazes para o estudo de produtos específicos da radiólise da água.
- As doses de radiação escolhidas permitiram identificar a dose de 2000 Gy como discriminatória.
- A radiação gama causa alterações na conformação das toxinas e desdobramento das cadeias polipeptídicas e esse fenômeno é potencializado quando as toxinas são irradiadas, na presença de "scavengers".
- Nas doses de 2000 e 10000 Gy a crotamina tende a formar moléculas complexas, como dímero, trímeros e até oligômeros.
- Não houve alterações significativas na atividade enzimática da crotalina nativa na presença dos "scavengers".
- A atividade enzimática foi protegida na presença de substâncias "scavengers", com destaque para a dose de 2000 Gy.
- A produção de anticorpos contra a crotalina irradiada, reconheceu a toxina nativa.
- O radical hidroxila é o responsável por manter as propriedades imunogênicas das toxinas irradiadas com 2000 Gy.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. E. ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON,R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions of inorganic radical anion with amino acids. **Radiat. Res.**, 49: 178-189, 1972a.
- ADAMS, G.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH,J.L. & WILLSON,R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of ribonuclease **Radiat. Res.**, 49: 290-299, 1972b.
- ADAMS, G.E.; & POSENER, M.L. Free radical reaction with proteins and enzymes: the inactivation of pepsin. **Int. J. Radiat. Biol.**, 35(6): 497-507, 1979.
- AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.**, v. 422, p. 198 – 207, 2003.
- 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**, 25: 7054 – 7058, 1985.
- ALEXANDRE, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J.; Giroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, 26: 953 – 960, 1988.
- ANDRIANI, E. P. **Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas.** (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.
- BARIDE,R. M.; JAIN, S.D. & GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. **Indian. J. Med. Res.**, 72: 571-6, 1980.

- BARROW, G. M. Introduction to molecular spectroscopy, **McGraw- Hill**, N. Y. 1962.
- BELTRAN, J. R.; MASCARENHAS, Y. P.; CRAIEVICH, A. F.; LAURE, C. J. SAXS study of the snake venom toxin α -crotoxin, **Eur. Biophys. J.** v.17 p. 325 – 329, 1990.
- BELTRAN, J. R.; MASCARENHAS, Y. P. SAXS study of structure and conformation changes of crotoxin. **Biophys. J.**, v. 47, p. 33 – 35, 1985.
- BRADFORD, M.M – A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248 - 254, 1976.
- BILLANY, M. R.; KHATIB, K.; GORDON, M.; SUGDEN, J.K. Alcohols and ethanolamines as hydroxyl radical scavengers. **Int. J. Pharm.** v.137 p. 143 - 147, 1996.
- BON, C.; RADVANIY, F.; SALIOU, B.; FAURE, G. Crotoxin: a biochemical analysis of its mode of action. **J. Toxicol. – Toxin Review.**, 5:2:125-138, 1986.
- BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high-energy radiation on biological system. **Rad. Phys. Chem.**, 24: 273-282, 1984.
- CHANG, C. C. & TSENG, K. H. Effects of crotoxin, a toxic of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **B. J. Pharmacol.**, v. 63, p. 551 – 559, 1978.
- CHEN, R. F.; EDELHOCH, H.; STEINER, R. F. Physical principles and techniques of protein chemistry, Part A, **Ed. S. J. Leach, Academic Press**, N.Y. 1969.

- CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F. Effects neuromusculaires des venins deux varietes de *Crotalus durissus terrificus*. **Archs. Int. Pharmacodyn.**, v.179, p. 40 – 55, 1969.
- CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F. Action neuromusculaire comparré de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var *crotaminus*. I. Sur préparations neuromusculaire in situ. **Toxicon.**, v. 9, p. 279 – 286, 1971a.
- CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F. Action neuromusculaire comparré de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var *crotaminus*. II. Sur préparations isolées. **Toxicon.**, v. 9, p. 287 – 289, 1971b.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas.** (Dissertação de Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1997.
- CZAPSKI, G. On the use of OH[•] Scavengers in Biological System. **Israel J. Chem.**, v.24, p. 29 – 32, 1984.
- ENDO, T.; OYA, M.; OZAWA, H. *et. al.* A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crotamine. **J. Protein. Chem.**, 8: 807-815, 1989.
- FLOYD, R. A.; WEST, M.; HENSLEY, K. Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. **Experimental Gerontology.**, 36. 619-640, 2001.
- FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archs. Biochem.**, v. 60, p. 64 – 73, 1956.

- GALLACCI, M.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J. R.; VASSILIEFF, V. S. Influence of temperature upon effects of crotoxin and gamma-irradiated crotoxin at rat neuromuscular transmission. **Toxicology letters**. 114: 77-80, 2000.
- GALLACCI, M; NUNES, E. C.; MOREIRA, E. G. Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockage by gamma radiation. **Toxicon**, v. 36, p. 941 – 945, 1998.
- GARRISON, W. M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, **Chme. Rev.**, v. 87, p. 381 – 398, 1987.
- GUARNIERI, M.C. **Estudos dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de Bothrops jararaca.** (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1992.
- GUILBAULT, G. G. **Practical Fluorescence.** Second Edition, Revised and Expanded. **Marcel Dekker, Inc**, 1990.
- GREENSTOCK, C. L. Redox process in radiation biology and cancer. **Radiat. Res.**, v. 86, p. 196 – 211, 1981.
- GROSH, D. S. & HOOPYWOOD, L. E. **Biological effects of radiation.** 2 ed. New York, Academics Press, 1979.
- HAMPE, O. G.; VOZARI-HAMPE, M. M.; GONÇALVES, J.M. Crotoxin conformation: Effects of pH and Temperature. **Toxicon**, v. 16, p. 453 - 460, 1977a.
- HAMPE, O. G. Model studies of crotoxin self-association. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 22, p. 17 - 24, 1990.
- HAMPE, O. G. & GONÇALVES, J.M. Optical rotatory dispersion of crotoxin: effects denaturants. **Polymers**, v. 17, p. 638 - 639, 1977b.

- HATI,A.K.; HATI, R.N.; MANDAL, M.; PANDA,D. DAS,S. The effects of gamma radiation detoxified viper venom as a toxoid against viper venom. **The Snake**, 21: 36-40,1989.
- HOLZER, M. & MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, 34, 10: 1149 – 1155, 1996.
- JAFFE, H. H.; ORCHIN, M. Theory and applications of ultraviolet spectroscopy. **Jhon Wiley, N. Y.**, 1962.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLMCHIK, M. *Imunologia – O sistema imune na saúde e na doença*. **Artmed Editora.**, 2002.
- JORGE, M. T.& RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. **Rev. Ass. Med. Bras.** v. 36, p. 66-77, 1990.
- KAWANO, Y. LAURE, C. J.; GIGLIO, J. R. Laser Raman on crotoamine. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 705, p. 5 – 20, 1982.
- KEMPER, E. S. Damage to protein due the direct action of ionizing radiation. **Q. Rev. Biophys.** V. 26, p. 27 – 48, 1993.
- KUME, T.& MATSUDA, T. Changes in structure and antigenic proprieties of proteins by radiation. **Rad. Phys. Chem.** V.46, n. 2, p. 225 – 231, 1995.
- LAURE, C. J. Die Primar strutur des crotamins. **Hope Seylers z. Physiol. Chem.**, 356: 213 – 215, 1975.
- LI, Y.; FORAN, P.; FAIRWEATHER, N. F.; PAIVA.; WELLER, U.; DOUGAN, G.; DOLLY, J. O. A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes it's proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain. **Biochemistry.** v. 33 p. 7014 – 7020, 1994.

- LIN, D.; TABB, D. L.; YATES, J. R. Large-scale protein identification using mass spectrometry. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1646, p. 1 – 10, 2003.
- MATAVEL, A. C. S.; FERREIRA-ALVES, D. L.; BEIRÃO, P. S. L. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crostamine. **Europ., J. Pharmacol.**, 348: 167-173, 1998.
- MEYER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K. F. **Medical Use of Snake Venom Proteins.** Boca Ratorn, Boston, 57-65, 1990.
- MILLIGAN, J. R.; AGUILERA, J. A.; WARD, J. F. Variation of single strand break yield with scavenger concentration for the SV 40 minichromosome irradiated in aqueous solutions. **Radiat. Res.** 133(2): 158-162, 1993.
- MITAKE, M. B.; COSTA, H.; SPENCER, P. J.; VASSILIEFF, V. S.; ROGERO, J. R. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crostamine. **Brazil. J. Med. Biol. Reserch.** 34: 1531 – 1538, 2001.
- MITAKE, M. B. **Estudos bioquímicos e farmacológicos das crostaminas nativa e irradiada com radiação gama ⁶⁰Co.** (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.
- MOON, S. & SONG, K. B. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucid and protection by ascorbic acid. **Food Chemistry.** v 74 p. 479 – 483, 2001.
- MURATA, Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*.** (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1988.
- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C. S.; FRANCIS, B.; *et. al.* Influence of ionizing radiation on crostoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, 34: 121-131, 1996.

- NASCIMENTO, N. **Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina.** (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.
- NICASTRO, G.; FRANZONI, L.; DE-CHIARA, C.; MANCIN, A. C.; GIGLIO, J. R.; SPISNI, A. Solution structure of crothamine, a Na⁺channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. v. 270, p. 1969 - 1979, 2003.
- OGUIURA, N.; CAMARGO, M. E.; DA SILVA, A. R. P.; HORTON, D. S. P. Q. Quantification of crothamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. **Toxicon**, v. 38, p. 443 – 448, 2000.
- PURANANANDA, C. Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization. **Vienna, IAEA**, 1972.
- PURANANANDA, C.; HAYODOM, V.; LAOHATIRANANDA, P. & GANTHAVORN, S. Study of immune response irradiated Cobra venom in rabbits. **J. Nat. Res. Conc. Thailand**, 8-9: 17-27, 1976/77.
- RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N. HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, M. E.; GREGO, K. F. OLIVEIRA, E. B. YAMANE, T. Nucleotide sequence of crothamine isoforms precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon.**, v. 37, p. 973 – 984, 1999.
- RADVANYI, F.; ROUSSELET, A.; DEVAUX, P.; BON, C. Interaction of crothoxin and it's isolated subunits with spin-labeled fatty acids. **J. Biol. Chem.** 260: 15: 8765-8770, 1985.
- ROGERO, J. R. & NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. **J. Venom. Anim. Toxin.** (1)1, 7-10, 1995.

- ROGERO, J. R. & NASCIMENTO, N. Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**. (2): 24-26, 1997.
- ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. **Doenças infecciosas e parasitárias**, E. Guanabara- Koogan. Rio de Janeiro, 1991.
- SOUZA-FILHO, J. N. **Efeitos da Radiação ionizante na crotoxina (toxina do veneno *Crotalus durissus terrificus*: Estudo ao nível molecular** (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares. São Paulo, 1988.
- SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, 129: 1361 – 1363, 1959a.
- SCHUESSLER, H.; SCHILLING, K. Oxygen effects in the radiolysis of protein II. Bovine serum albumine. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 45, n. 3, p. 267 – 281, 1984.
- SPENCER, P. J. **Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ^{60}Co** : (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares. São Paulo, 1995.
- STRONG, P. N. Potassium channels toxins. **Pharmac. Ther.**, v. 46, p. 137 – 162, 1990.
- TENO A. M. VIEIRA, C. A. SANTORO, M. M. Interchain disulfide bonds in crotamine self-association. **J. Biochem.** v. 107, p. 821 – 825, 1990.
- TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R. L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A. C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin

- secretion by pancreatic islets. **Biochem. et Biophys. Acta.** v. 1474, p. 56 – 60, 2000.
- TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. NOVELLO, J. C.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotamine isoforms F22 and F32. **Toxicon**, v. 41, p. 493 - 500, 2003.
- TU, A T. Use of raman spectroscopy for the study of snake venoms. **J. Toxicol. – Toxins Reviews.**, v. 12, 203 – 224, 1993.
- VARGAFTIG, B. B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHIGNARD, M.; CHEVANCEM, L. G. Convulxin, induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. **Eur. J. Pharmacol.**, 92: 57 – 68, 1983.
- VITAL-BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Ver. Ass. Méd. Brasil**, 26: 212 – 218, 1980.
- VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crotamine. **Mem. Inst. But.**, v. 52, p. 23 – 24, 1990.
- YANG, J.S, KIM, J.H. MATSUHASHI ,S., KUME, T. Changes in biochemical properties of ovomucoid by radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 48, n. 6, p 731 - 735, 1996.
- WHO. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms, **Geneva**, 1981.