

BIOLOGICAL ACTIVITY AND STRUCTURAL ALTERATIONS IN GYROXIN INDUCED BY GAMMA RADIATION

Maria A.P Camillo*¹; José A Alves da Silva; Camila M Yonamine; Juliana L Hashizume; Murilo S. C da Silva; Olga Z Higa

¹Centro de Biologia Molecular – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP)
Av. Professor Lineu Prestes, 2242
05508-000 São Paulo, SP. Brasil
* mcamillo@ipen.br

ABSTRACT

The irradiation of macromolecules or living organisms has been largely used to improve their immunogenic properties for vaccines and toxoids attainment. Irradiation with ⁶⁰Co gamma ray successfully detoxify animals venom for antiofidic serum production. To characterize the radiation effect on isolated toxins, some physico-chemical methods were used. It was possible to identify some radicals formed during irradiation and its interaction with proteins leading to structural and conformational modifications. The objective of this study is to characterize the effect of ⁶⁰Co gamma ray irradiation (GammaCell, Atomic Agency of Canada Ltd) in gyroxin structure and some biological activities. Gyroxin is a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom, showing neurotoxic and fibrinolytic activities. For this work, this toxin was purified, dissolved in saline solution and irradiated with 2000Gy at room temperature. The chromatographic and electrophoretic analysis showed aggregated forms formation and break of backbone chain. The irradiation of toxin lead the molecular alterations consequently changing the protein conformation as observed by UV-visible spectra. The enzymatic and cytotoxicity activities of the irradiated and native gyroxin were compared.

A irradiação, com gama de ⁶⁰Co, de macromoléculas ou organismos vivos tem melhorado suas propriedades imunogênicas para a produção de soros ou vacinas; sendo particularmente útil para venenos animais e/ou toxinas isoladas. Vários estudos têm contribuído para caracterizar os efeitos da radiação nestes sistemas - métodos físico-químicos estudam as alterações estruturais e os principais radicais formados durante a irradiação, assim como, estudos imunológicos tentam diferenciar o processamento das toxinas nativas e irradiadas. Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos com a irradiação da giroxina abordando alguns aspectos estruturais e de atividade biológica. A giroxina é uma enzima trombina-símile isolada do veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* e está relacionada aos sintomas de neurotoxicidade e alterações de hemostasia. Foi irradiada com 2000Gy, em solução salina e à temperatura ambiente. As análises em cromatografia e eletroforese evidenciaram a formação de agregados e de fragmentos. A análise do espectro de absorção UV-visível confirmou a ocorrência de alterações conformacionais e, as alterações de atividade biológica foram confirmadas por ensaio enzimático e de citotoxicidade.

1. INTRODUCTION

No Brasil, os acidentes com animais peçonhentos ainda ocorrem com frequência, cerca de 20.000 casos/ano [2]. O atendimento destes pacientes é feito no sistema público de saúde com a administração do soro antiofidico específico. Diversos estudos vêm demonstrando que a produção deste medicamento pode ser melhorada com o uso da radiação. A irradiação com gama de cobalto-60 na dose de 2000Gy tem mostrado ser a ideal para a otimização dos inóculos dos venenos utilizados na produção do soro antiofidico. Estes inóculos atenuados

causam menor sofrimento ao animal soro produtor, menor mortalidade e as imunoglobulinas circulantes são produzidas em maior quantidade; reconhecem e neutralizam o veneno nativo sendo, portanto, adequadas para a utilização em testes clínicos para uso em medicina ou veterinária [1,3]. Para o aprimoramento desta metodologia é necessário o entendimento das respostas biológicas e das alterações químicas envolvidas.

Estudos recentes demonstraram diferenças na resposta imune para a bothropstoxina-1 nativa e a submetida à radiação gama. Este resultado indica que as proteínas irradiadas são processadas de forma diferente pelas células apresentadoras de antígenos. Foi demonstrado que as proteínas nativas induzem preferencialmente respostas do tipo TH2, auxiliando a produção de anticorpos por linfócitos B, enquanto que proteínas irradiadas induzem resposta em células TH1, influenciando a produção de IgG2a e envolvendo a ativação de macrófagos [4]. Nos estudos com toxinas isoladas foi possível demonstrar alguns aspectos da interação da radiação com estas moléculas, caracterizando alterações conformacionais e na estrutura primária [4,8]. A adição de “scavengers” no meio de irradiação contribuiu para identificar as principais espécies reativas de oxigênio envolvidas [5].

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem sido um importante objeto da utilização da radiação como ferramenta de atenuação, por sua importância clínica, sua toxicidade e composição relativamente simples. Possui algumas toxinas majoritárias, das quais a crotoxina e a crotamina tem sido os principais componentes analisados para estabelecer os efeitos da radiação e a resposta imune envolvida. Este trabalho visa contribuir com esta pesquisa tendo como objeto de estudo outra importante toxina do veneno crotálico, a giroxina. Esta toxina representa cerca de 2,5% do peso seco e possui características estruturais diferentes das duas já estudadas. É uma glicoproteína com massa molecular de 29000 Da; pertence à classe das enzimas trombina-símile e contribui para o agravamento do quadro clínico tornando o sangue incoagulável em 30 a 50% dos pacientes [2,6]; sendo também responsável por uma síndrome neurotóxica denominada rolamento em barril [7].

2. MATERIAL E MÉTODOS

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido junto ao CEVAP, Unesp - Botucatu/SP; na forma liofilizada. A giroxina foi isolada em gel filtração e coluna de afinidade [7]. Para a irradiação foi utilizada uma fonte Gamma Cell 220, proveniente da Atomic Energy Agency of Canada. A taxa de dose utilizada foi 3,75 kGy/h e a dose 2000Gy. A giroxina foi irradiada à temperatura ambiente após dissolução em solução salina (cloreto de sódio 150 mM) e esterilização por filtração 0,2 µM (Millex^R).

Para caracterização dos efeitos da radiação foram feitos os testes de dosagem protéica, determinação de açúcares totais da cadeia glicídica, análise em HPLC e em eletroforese, espectro de absorção UV-visível, atividade enzimática e citotoxicidade.

2.1 Dosagem protéica.

Após a irradiação a amostra foi centrifugada a 10000 g durante 1 minuto. A dosagem protéica foi feita no sobrenadante utilizando-se albumina bovina como referência (3 a 100 µg/100 µL) [9]. O ajuste da curva por regressão linear e os cálculos para determinações das concentrações das amostras foram feitos com o programa GraphPad Prisma.

2.2. Quantificação de açúcares totais.

Para a medida dos açúcares totais foi utilizado o método do fenol-ácido sulfúrico [10], tendo como referência uma solução de glicose em água com concentrações entre 2 a 60 µg/200 µL. O ajuste da curva por regressão linear e os cálculos para determinações das concentrações de açúcares totais nas amostras foram feitos com o programa GraphPad Prisma.

2.3. Análise em HPLC.

Para esta análise foi escolhido o sistema em gel filtração que permite detectar alterações na molécula por diferenças na eluição (tempo de retenção). Utilizou-se uma coluna TSK-2000 (Toso Haas) e tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH7,0 como eluente. O fluxo foi 1 mL/min e a detecção por absorção UV em 220 nm.

2.4. Espectro de absorção UV.

A absorvância no intervalo de 200 a 360 nm foi medida para as amostras de giroxina nativa e irradiada. Para tanto utilizou-se um espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia) com varredura e registro automáticos. Como branco utilizou-se a mesma solução salina de solubilização da toxina.

2.5. Análise em eletroforese.

A análise em eletroforese utilizou sistema desnaturante não reduzido [11]. As concentrações dos géis de poliácridamida foram 15% e 6% para resolução e empilhamento respectivamente e o método de coloração escolhido foi com azul de coomassie (CBB R-250).

2.6. Atividade enzimática.

Neste ensaio foi utilizado tosil arginina metil ester (TAME) como substrato na concentração 2,5 mM e tripsina como enzima de referência [12]. A reação ocorreu em tampão Tris HCl 80mM pH 8,1 contendo CaCl₂ 20mM, à temperatura de 25°C. Foram incubados 1mL do substrato com 5µg de cada amostra e medida a variação da absorvância em 247 nm, por até 5 minutos.

2.7. Ensaio de citotoxicidade.

Para este ensaio as células utilizadas foram CHO-K1 (Chinese hamster ovary-K1 cells) cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (ampicilina e estreptomicina). A suspensão celular foi distribuída na concentração de 6000 células/100 µL em cada poço (placas de 96 poços) e, em seguida, adicionada a giroxina nativa ou irradiada, em concentrações entre 1 a 600 µg/mL. Após incubação por 48 horas a 37°C e 5%CO₂, foi adicionado uma mistura de corantes vitais (20:1 de MTS 0,2% e PMS 0,9%) em tampão fosfato salina. A medida da absorvância em 490 nm foi feita após 2 horas de incubação nas condições já especificadas. Este ensaio foi feito logo após a irradiação e uma semana após, com as amostras estocadas congeladas a -20°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dose de 2000 Gy tem mostrado ser a ideal para a preparação de imunógenos irradiados em solução salina em concentrações entre 1 a 2 mg/mL. Nestas condições o efeito da ação direta é praticamente inexistente portanto, os efeitos da radiação gama sobre estas proteínas devem-se à interação com produtos da radiólise da água. Ocorrem processos oxidativos importantes, principalmente pela ação dos radicais livres primários ou seus produtos.

A dosagem de proteínas demonstrou que não ocorreu precipitação visível da giroxina após a irradiação, pois não houve diferença significativa entre as amostras nativa e irradiada (2,083 e 1,998 mg/mL respectivamente). A curva padrão obtida foi $Y = 0,046X + 0,043$ com $r^2 = 0,9992$ (ajustada por regressão linear).

A quantificação de açúcares totais da cadeia de carboidratos indicou uma pequena perda de 3,8% para 3,4%. A curva padrão obtida, ajustada por regressão linear, foi $0,035X - 0,036$ com $r^2 = 0,9952$.

Na análise em HPLC obteve-se o tempo de retenção de 18,45 min. para a giroxina nativa e 17,82 min. para a irradiada. Esta pequena diminuição no tempo de retenção sugere um aumento do volume da giroxina irradiada; o que pode estar relacionado a rompimentos de ligações internas da estrutura secundária. Por efeito da radiação, as proteínas podem sofrer desaminação e/ou destruição de aminoácidos, rompimento da cadeia peptídica, alterações das ligações -H-H- e/ou das ligações -S-S- intramoleculares.

A análise em eletroforese indicou a presença da banda de giroxina em ambas as amostras e o aparecimento de novas com maior e menor massa molecular na irradiada, confirmando os dados do HPLC.

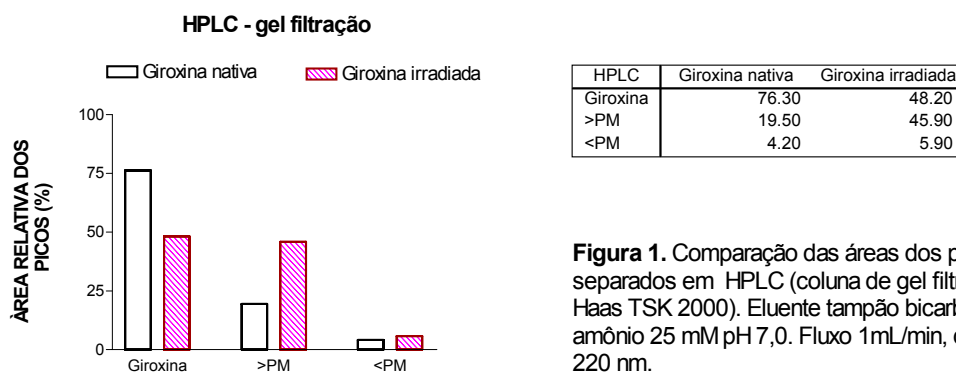


Figura 1. Comparação das áreas dos picos separados em HPLC (coluna de gel filtração Toso Haas TSK 2000). Eluente tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 7,0. Fluxo 1mL/min, detecção em 220 nm.

A comparação das áreas dos picos dos cromatogramas do HPLC mostrou uma diminuição do pico da giroxina após a irradiação e um aumento nos picos de maior e menor massa molecular; indicando a presença de agregados e fragmentos formados como produtos da irradiação (Fig. 1). A formação de agregados pode ocorrer após a redução de ligações -S-S- com formação de radicais tiol, os quais parcialmente combinam-se intramolecularmente formando compostos protéicos de alta massa molecular.

O espectro de absorção UV-visível mostrou uma diminuição da absorvância da amostra

irradiada em relação à nativa em todo o espectro (Fig.2); sugerindo perdas ou menor exposição de grupos cromóforos; provavelmente, aminoácidos aromáticos (Trp, Phe e Tyr - entre 250 a 300 nm) e ligações peptídicas (entre 200 a 220 nm). Todos os aminoácidos nas proteínas estão sujeitos ao ataque por radicais hidroxilas gerados por radiação ionizante, no entanto, os aromáticos e os contendo enxofre são mais sensíveis a oxidação.

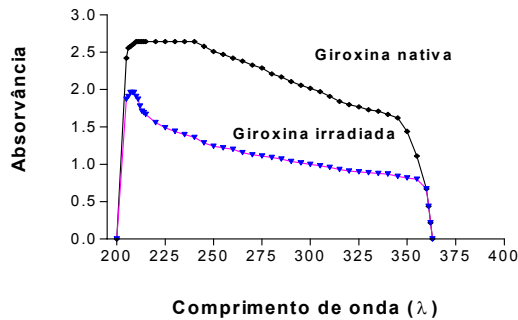


Figura 2. Espectro de absorção UV-visível comparando a giroxina nativa e a irradiada a 2 kGy, em solução salina 2mg/mL

A comparação entre a forma nativa e a irradiada não apresentou diferenças importantes na atividade esterásica, característica da giroxina (Fig. 3).

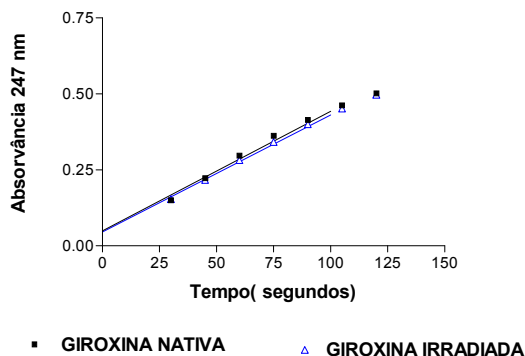


Figura 3. Comparação da atividade esterásica entre a giroxina nativa e a irradiada. Substrato TAME 2,5 mM.

A giroxina irradiada foi mais citotóxica do que a nativa (Fig. 4). O ajuste das curvas facilitou o cálculo da concentração tóxica 50% (CT50%) e a comparação entre as amostras. Este teste possui correlação com a toxicidade sistêmica *in vivo* [13].

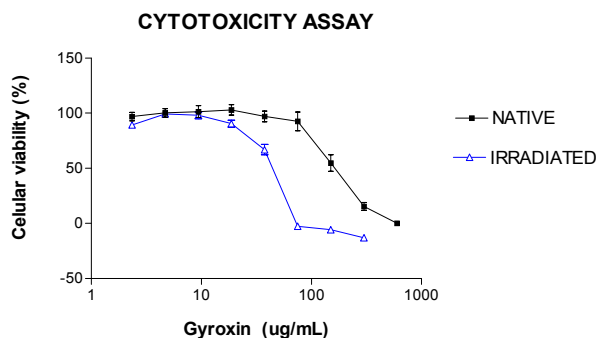


Figura 4. Curvas de citotoxicidade em células CHO-K1, comparando a giroxina nativa e a irradiada com 2000Gy.

É conhecido que as reações relacionadas a reorganização da molécula protéica após a irradiação (agregação, formação de ligações cruzadas entre moléculas, oxidação do “esqueleto” das ligações peptídicas, fragmentação da proteína etc) podem levar a mudanças nas propriedades biológicas - enzimáticas, farmacológicas e imunológicas. No caso da gioxina, as condições de irradiação não foram suficientes para alterar sua atividade esterásica, no entanto, aumentou muito a citotoxicidade. Este foi um resultado inesperado pois é contrário ao obtido com outras toxinas [4,11]; no entanto pode estar relacionado às alterações induzidas na cadeia de carboidratos e será a próxima abordagem desta pesquisa.

4. CONCLUSÕES

A dose de 2000Gy induziu várias alterações estruturais na gioxina, corroborando os resultados obtidos com o veneno total e outras toxinas isoladas.

As determinações de proteínas e açúcares assim como as análises em gel filtração e em eletroforese comprovaram que, embora não tenha ocorrido precipitação, houve formação de compostos de maior massa molecular (agregados) e de fragmentos de menor massa molecular originados por quebras na cadeia polipeptídica.

A atividade esterásica não foi alterada por ação da radiação mas houve um aumento da citotoxicidade da proteína.

REFERÊNCIAS

1. P.B.Clissa, N.Nascimento, J.R.Rogero. “Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays”. *Toxicon*, **37**, pp.1131-41 (1999).
2. Ministério da Saúde. “*Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*”. **FUNASA**, Brasília, Brasil (2001).
3. N.Nascimento., C.S.Seebart, B. Francis, J.R.Rogero, I.I.Kaiser. “Influence of ionizing radiation on crotoxin:biochemical and immunological aspects”. *Toxicon*, **34**, pp.123-31 (1996).
4. J.B.Alves; P.J.Spencer, J.E.Oliveira, M.S.Casare, L.A Campos; N.Nascimento. Immune response against antigens irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays. *Proceedings of 8th International Conference on Nuclear Analytical Methods in the Life Sciences, Rio de Janeiro, Brazil, 17-22 April, pp.54 (2005)*
5. M.C.Casare. *Influência das principais espécies reativas formadas durante o processo de destoxicação de toxinas por radiação ionizante*. Dissertação de Mestrado. **IPEN, São Paulo, Brazil** (2003).
6. I.Raw; M.C.Rocha; M.I. Esteves; A S Kamiguti. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz.J.Med.Biol.Res.*; **19** pp.333-338 (1986)
7. M.A P.Camillo, P.C.Arruda Paes, L.R.P.Troncone, J.R.Rogero.”Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue”. *Toxicon*, **39**, pp. 843-853 (2001).
8. M.B.Mitake; H. Costa; P.J.Spencer; J.R.Rogero. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crotoxin. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **34**, pp. 1531-1538 (2001).
9. M.M.Bradford. “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* **72**, pp.248-254 (1976).
10. T.Masuko, A Minami, N Iwasaki, T. Majima, S.Nishimura, Y.Lee. “Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format”. *Anal.Biochem.***339**, pp.69-72 (2005)
11. U.K.Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*, **227**, pp.680-685 (1970).
12. C.Nolan, L.S.Hall, G.H.Barlow. “Ancrod, the coagulating enzyme of *Agkistrodon rhodostoma* venom”. *Methods in Enzymology* **45**, pp.205-213 (1976).
13. E. Borefreund, J.A Puerner. “A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay – HTD/NR.90”. *J.Tissue Culture Meth.*, **9**, pp.7-9 (1984)