

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTOXINA (TOXINA DO VENENO
DE Crotalus durissus terrificus)**

Jayme Nunes de Souza Filho e José Roberto Rogero

PUBLICAÇÃO IPEN 155

JULHO/1989

SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTOXINA (TOXINA DO VENENO
DE Crotalus durissus terrificus)**

Jayme Nunes de Souza Filho e José Roberto Rogero

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO – BRASIL**

INIS Categories and Descriptors

C 11.00

ATTENUATION

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

GAMMA RADIATION

SNAKES

TOXINS

VENOMS

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTOXINA (TOXINA DO VENENO DE Crotalus durissus terrificus)

Jayme Nunes de Souza Filho & José Roberto Rogero

RESUMO

A crotoxina é uma potente neurotoxina encontrada no veneno de Crotalus durissus terrificus. Tal proteína foi isolada utilizando cromatografia por exclusão molecular em gel Sephadex G-75 e irradiada em uma fonte GAMMACELL ⁶⁰Co na concentração de 2mg/ml NaCl 0,85% sob taxa de dose de $1,19 \times 10^3$ Gy/hr em doses de 250, 500, 1000 e 2000 Gy para as respectivas alíquotas. Partindo destas, determinou-se o conteúdo proteico, a reação de imunodifusão em agar frente ao soro anti-crotálico e ainda eletroforese em placa (SDS-PAGE). Os dados mostraram alterações significativas na toxina irradiada. Resultados preliminares com dose de radiação de 100, 250, 500 e 1000 Gy mostraram que a dose letal 50% em camundongos aumenta significativamente com o aumento da dose de radiação.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON CROTOXIN (TOXIN OF Crotalus durissus terrificus VENOM)

ABSTRACT

The crotoxin is a great neurotoxin found on Crotalus durissus terrificus venom. This protein was isolated using molecular exclusion chromatography with Sephadex G-75 and irradiated in a source of ⁶⁰Co GAMMACELL in the concentration of 2 mg/ml 0.85% NaCl with dose rate of 1.19×10^3 Gy/hr. The doses used were 250, 500, 1000 and 2000 Gy, It was determined for this samples, the proteic concentration, the diffusion immunoassay using crotalic antiserum and eletrophoresis (SDS-PAGE). The results showed some changes on the irradiated toxin. Preliminary results with doses of radiation of 100, 250, 500 and 1000 Gy showed that the letal dose 50% (LD50) in mice increase greatly with the increase of radiation's dose.

INTRODUÇÃO

A crotoxina, constituinte proteico da peçonha de Crotalus durissus terrificus, apresenta-se como uma potente neurotoxina, que aliada a outras frações tóxicas, torna a peçonha deste ofídio altamente poderosa (1).

A crotoxina foi primeiramente isolada e cristalizada por Slotta, C.H. e Fraenkel-Conrat, H. (18), em 1938. Os resultados de análise amino-terminal e executados por Fraenkel-Conrat, H. e Singer, B. mostraram a presença de duas sub-unidades distintas na crotoxina(4). Utilizando cromatografia de troca iônica, Rubsamen, K. et alli (17) e Hendon, R.A. e Fraenkel-Conrat, H. (8), separaram a crotoxina em duas proteínas diferentes. Uma sub-unidade básica que continha atividade de fosfolipase A e uma sub-unidade ácida nomeada de crotapotin.

Quando olhadas isoladamente, a crotapotin apresenta-se atóxica e a fosfolipase A carrega uma alta e indireta atividade hemolítica (8).

A interação das duas sub-unidades por ligação não covalente e reversível, provoca o aparecimento de uma toxicidade 10 vezes maior quando comparada com a fosfolipase A isolada (13). Essa associação também evidencia um possível mascaramento da atividade enzimática da fosfolipase A pela crotapotin, promovendo uma maior especificidade ao complexo, levando-o ao alvo neuronal (9, 10).

É oportuno colocar que alguns trabalhos sugerem possíveis alterações estruturais do complexo-crotoxina quando a associação das sub-unidades, provavelmente favorecendo seu comportamento biológico (6, 16).

Por outro lado, as radiações ionizantes possuem a capacidade de alterar, dependendo da dose e condições de irradiação, significativamente ou até drasticamente o comportamento biológico, imunogênico e antigênico de uma toxina.

As condições de irradiação tomam relevante importância nos danos provocados pela radiação na macromolécula proteica. São nomeados de efeitos diretos da radiação, quando a molécula biológica é irradiada a seco, prevalecendo assim o depósito de energia diretamente na molécula. Deve-se ressaltar que uma molécula proteica possui um certo grau de hidratação, evidenciando o possível radiólise da água. Por sua vez, os efeitos indiretos da radiação ocorrem quando a molécula é irradiada em solução aquosa (5).

Nos efeitos indiretos da radiação, a radiação ionizante provoca a formação dos produtos primários da radiólise da água, como por exemplo, OH^\bullet , H_2O_2 , H^\bullet , e aq^- e outros. Esses produtos formados pela radiólise da água atacarão determinados grupos da proteína, provocando danos (2,5). Dentre outros exemplos típicos, citamos algumas reações danosas ocorridas com a molécula proteica na presença de radicais livres formados: o radical hidroxila (OH^\bullet) pos

sui a capacidade de reagir com o átomo de hidrogênio ligado ao carbono-alfa de um certo resíduo, abstraindo-o; ou então, reagir com grupos SH livres de resíduos de cisteínas, abstraindo o átomo de hidrogênio e conseqüentemente, promover a formação de radicais RS^{\cdot} , podendo esses ainda rearranjar-se (2). O radical H^{\cdot} pode também reagir com o átomo de hidrogênio do carbono-alfa, abstraindo-o (2).

A irradiação também contribui para a formação de ligações covalentes intermoleculares, promovendo o aparecimento de dímeros, trímeros e outros, favorecendo até o aparecimento de um precipitado em solução. A formação de agregados pode possivelmente contribuir para a perda da atividade biológica da molécula, pelo mascaramento de sítios de ação (2).

Aqui, a preocupação reside no estudo dos efeitos provocados pela radiação gama ^{60}Co na crotoxina, tentando visualizar modificações estruturais, comportamento biológico e ainda antigênico da toxina irradiada em solução aquosa, em comparação com a toxina nativa.

MATERIAL E MÉTODOS

I- Obtenção e purificação da crotoxina

Cerca de 300 mg de veneno total de C. d. terrificus foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de 80 cm x 2,5 cm de diâmetro e empacotada com gel Sephadex G-75 em ácido acético 0,1 M.

A crotoxina isolada, foi submetida a uma recromatografia nos mesmos moldes.

II- Preparação e irradiação da crotoxina.

Fez-se uma solução na concentração de 2 mg de crotoxina/ml NaCl 0,85%. A seguir, adicionou-se algumas gotas de HCl 0,1 M com o intuito de diminuir o pH da solução, resultando numa maior solubilidade da crotoxina. Após tal fato, alíquotou-se a amostra em 5 tubos (aproximadamente 1,5 ml/tubo), dos quais quatro foram submetidos a irradiação em uma fonte GAMMACELL ^{60}Co sob taxa de dose de $1,19 \times 10^3$ Gy/hr em doses de radiação de 250, 500, 1000 e 2000 Gy, mantendo uma alíquota como amostra nativa da toxina.

III- Determinação do conteúdo proteico

Utilizando o método de Lowry, O.H. (11) modificado por Miller, G.L. (12), dosou-se o conteúdo proteico de cada amostra. A soroalbumina bovina foi usada como padrão de dosagem.

As absorvâncias das amostras e padrões foram lidas em comprimento de onda de 650 nm em um espectrofotômetro Carl Zeiss FNQ II.

As concentrações finais das amostras, assim como as concentrações relativas encontram-se na Tabela 1.

IV- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em placa, na presença de dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol como denaturantes proteicos, com as amostras irradiadas e nativa de crotoxina e ainda veneno total nativo de C. d. terrificus.

As concentrações das amostras aplicadas foram de 150 μ g/ml NaCl 0,85%, aferidas pelo método de Lowry, O.H. modificado por Miller, G.L.

A placa foi corada com o auxílio do corante coomassie brilliant blue R250 e fotografada, a qual encontra-se na Figura 1.

V- Reação de imunodifusão em agar-agar

Baseando-se no método de Ouchterlony, O. (14), executou-se a reação de imunodifusão em agar-agar das amostras irradiadas e não irradiadas de crotoxina, frente ao soro anti-crotálico gentilmente cedido pelo Instituto Butantan.

O procedimento do método implicou na adição de 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 a 1 grama de agar-agar, solúvel sob aquecimento em banho-maria. Após, distribuiu-se 4 ml ao longo de uma lâmina de microscopia e aplicou-se o soro anti-crotálico e as amostras.

As lâminas foram conservadas em câmara úmida por um tempo de difusão de 24 horas, lavadas e coradas com negro de amido 0,4%.

A Figura 2 nos mostra as linhas de precipitação resultantes da identidade de antígeno-anticorpo na reação de imunodifusão.

VI- Determinação da dose letal 50% (DL50)

Com o intuito de observarmos a toxicidade das amostras irradiadas e nativa de crotoxina, realizou-se a determinação da dose letal intra-peritoneal para 50 por cento de uma população de camundongos albinos fêmeas, com inoculação de 0,2 ml/animal, da respectiva diluição.

As amostras foram para isso, irradiadas sob uma taxa de dose de $1,25 \times 10^3$ Gy/hr em doses de radiação de 100, 250, 500 e 1000 Gy.

As mortes e sobrevidas foram anotadas 24 horas após a inoculação das amostras, e os cálculos para a determinação da DL50 obedeceram o método de Reed, L.J. e Muench, H. (15), os quais encontram-se na Tabela 2.

RESULTADOS

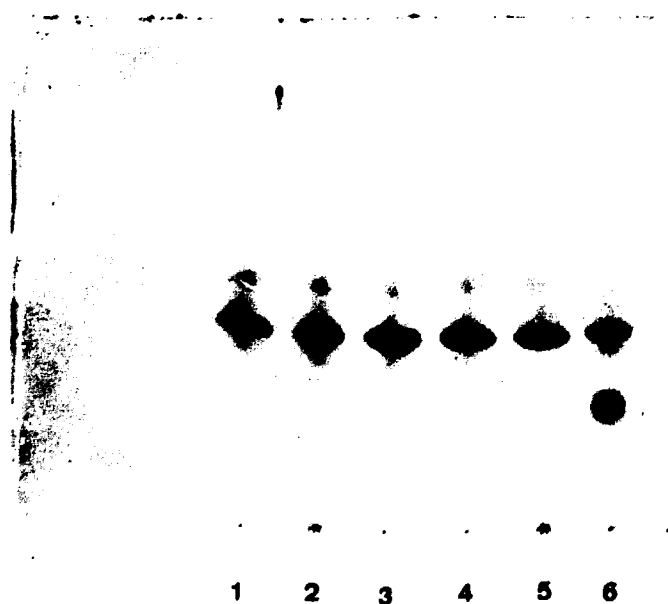
Após separação cromatográfica da crotoxina frente as outras frações do

veneno de Crotalus durissus terrificus, realizou-se algumas determinações bioquímicas e comportamento biológico das amostras de crotoxina irradiadas e nativa, as quais dispõem-se a seguir:

Tabela 1 - Determinação do conteúdo proteico

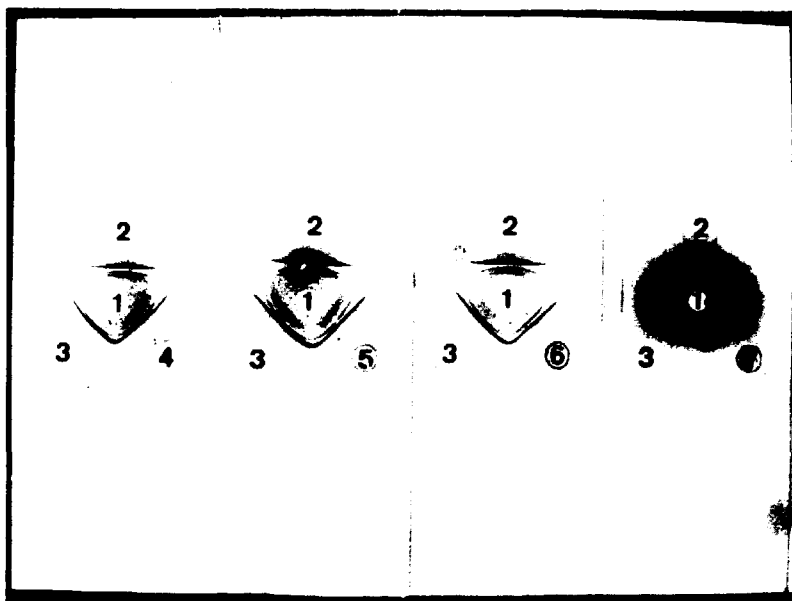
Amostra de crotoxina	Concentração (ug/ml)	Concentração relativa (%)
Cx nativa	2653	100
Cx 250 Gy	2633	99,2
Cx 500 Gy	2583	101,1
Cx 1000 Gy	2613	98,5
Cx 2000 Gy	2243	84,5

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)



- (1) crotoxina irradiada com 2000 Gy; (2) crotoxina irradiada com 1000 Gy; (3) crotoxina irradiada com 500 Gy; (4) crotoxina irradiada com 250 Gy; (5) crotoxina nativa; (6) veneno total nativo de C. d. terrificus.

Figura 2 - Reação de imunodifusão em agar-agar



(1) soro anti-crotálico; (2) veneno total nativo de C. d. terrificus; (3) crotoxina nativa; (4) crotoxina irradiada com 250 Gy; (5) crotoxina irradiada com 500 Gy; (6) crotoxina irradiada com 1000 Gy; (7) crotoxina irradiada com 2000 Gy.

Tabela 2 - Determinação da dose letal 50% (DL50)

Diluição (ug/kg)	% mortalidade				
	Cx nativa	Cx 100 Gy	Cx 250 Gy	Cx 500 Gy	Cx 1000 Gy
1000	100	100	100	100	100
500	87,5	100	100	75	0
250	66,6	75	100	0	0
125	16,6	0	0	0	0
62,5	0	0	0	0	0
31,25	0	0	0	0	0
DL50 (ug/kg)	198	198	177	397	709

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A crotoxina obtida cromatograficamente por gel filtração em Sephadex G-75, foi irradiada em várias doses de radiação gama ^{60}Co .

A determinação do conteúdo proteico superestimou as dosagens de crotoxina (2653 ug/ml NaCl 0,85% para a amostra nativa). Similar fato pôde ser verificado pelos achados de Darke, P.L. et alii (3), que trabalhando com fosfolipase A2 oriunda de veneno de Naja naja naja, propõem que o valor da concentração desta proteína seja multiplicado por um fator de correção de 0,66, para então obter o valor correto. Este fator de correção deve ser levado em consideração quando utiliza-se o método de Lowry, O.H. e a soroalbumina bovina como padrão de dosagem. Trabalhando com o mesmo veneno, Hazlett, T. L. et alii (7) usaram o fator de correção proposto, tanto para a determinação do conteúdo de fosfolipase A2 como para o veneno total, embora destacado a não acurácia do fator de correção para este último.

A superestimativa da crotoxina visualizada na Tabela 1 não foi corrigida por não termos um fator específico calculado e a análise ter uma característica relativa entre as amostras irradiadas e a amostra nativa. Quanto a esse tópico, podemos ressaltar que a concentração relativa da amostra irradiada com dose de 2000 Gy acusou 84,5% em relação a nativa, sugerindo a ocorrência de precipitado. Tal fato não foi visualizado nas doses de radiação inferiores a 2000 Gy, onde as concentrações mantiveram-se constantes.

A SDS-PAGE em placa revelou dados inerentes ao peso molecular das amostras irradiadas e não irradiadas de crotoxina, bem como o veneno total nativo de C. d. terrificus. Podemos observar no veneno total o aparecimento de uma banda cuja medida relativa de migração é pouco menor que a da crotoxina, e ainda de concentração muito pequena. Nota-se também uma banda de medida relativa de migração também menor em relação a da crotoxina, porém de peso molecular elevado. Uma outra banda bem visualizada, acusando medida relativa de migração maior, indica provavelmente a presença de crotamina no veneno total.

Em uma comparação da amostra nativa de crotoxina com aquelas irradiadas, podemos observar a ocorrência de um "arrasto" que aumenta com o aumento da dose de radiação e ainda "regiões de preferência" cêsses possíveis rearranjos podem ser fracamente notadas, aumentando também de intensidade com o aumento da dose. Essas visualizações ocorrem em maior grau nas regiões de pesos moleculares maiores ao da crotoxina, sugerindo possivelmente a formação de rearranjos proteicos, podendo provavelmente indicar polímeros de crotoxina formados pela ação da radiação.

A reação de imunodifusão em agar-agar mostrou que a antigenicidade da crotoxina manteve-se aparentemente íntegra até a dose de radiação de 1000Gy, enquanto que a dose de 2000 Gy deve provavelmente provocar algum comprometimento dos determinantes antigênicos da toxina, prejudicando sobremaneira a identidade, levando ao aparecimento de uma linha difusa, o que não acontece com a amostra nativa e aquelas irradiadas até a dose de radiação de 1000 Gy.

É oportuno salientar que na reação de imunodifusão em agar-agar, surgiu uma segunda linha de precipitação, indicando possivelmente um contaminante proteico extremamente imunogênico e antigênico, o qual não foi separado cromatograficamente da crotoxina.

A dose letal 50% (DL50) foi preliminarmente localizada para a amostra nativa de crotoxina e aquelas irradiadas. Notou-se a atenuação da toxicidade da ordem de 2 vezes para a amostra de crotoxina irradiada com 500 Gy e ainda 3,5 vezes para aquela irradiada com dose de 1000 Gy. As amostras irradiadas com doses de radiação 100 Gy e 250 Gy apresentaram-se igualmente tóxicas quando comparadas com a toxina nativa (DL50 ip. 198 ug/kg de animal). Este fato nos faz sugerir que a "região neurotóxica" da proteína está sendo alterada estruturalmente pela radiação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAZIL, O.V. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Bras., 26 (6): 212 - 8, 1980.
2. BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys Chem., 24 (3/4): 273 - 82, 1984.
3. DARKE, P.L.; JARVIN, A.A.; DELMS, R.A.; DENNIS, E.A. Further characterization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2. biochim. biophys. Acta., 626: 154 - 61, 1980.
4. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. Arch. Biochem. Biophys., 60: 64 - 73, 1956.
5. HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist. 2ed. New York, Harper & Row, 1978.

6. HANLEY, M.R. Conformation of the neurotoxic crotoxin complex and its subunits. Biochemistry, 18 (9): 1681-8, 1979.
7. HARZLETT, T.L. & DENNIS, E.A. Affinity chromatography of phospholipase A2 from naja naja, naja(indian cobra)venom. Toxicon, 23(3):454-6, 1985.
8. HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. Proc. Natl. Acad. Sciences, USA, 68: 1560-3, 1971.
9. HENDON, R.A. & TU, A.T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake. Neurotoxic action. Biochim.Biophys.Acta, 578: 243-52, 1979.
10. JENG, T.W.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CORAT, H. Search for relationships among the hemolytic phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 600-4, 1978.
11. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin pnenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-75, 1951.
12. MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Analyt. Chem., 31: 964, 1959.
13. NAKAZONE, A.K.; ROGERO, J.R.; GONÇALVES, J.M. Crotoxin. Immunology and interaction of the subunits. bras.J.Med.Biol.Res., 17: 119-28, 1984.
14. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5: 1-78, 1958.
15. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method od stimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hygiene, 47: 493-7, 1937.
16. ROGERO, J.R. Toxinas do veneno de Crotalus durissus terrificus. Interação proteína-proteína e cinética de troca isotópica H-T. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, 1979. (Dissertação de mestrado) (IIA- DI - 119).
17. RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; BABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Hauynyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. ,

· 270: 274 - 88, 1971.

18. SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. Memórias do Instituto Butantã, 12: 505-13, 1938.