

BR 8919657

ISSN 0101-3084

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM TOXINA ISOLADA NO VENENO
DE Crotalus durissus terrificus**

Jayme Nunes de Souza Filho e José Roberto Rojero

PUBLICAÇÃO IPEN 157

JULHO/1988

SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM TOXINA ISOLADA NO 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**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C 11.00

**ATTENUATION
BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS
GAMMA RADIATION
SNAKES
TOXINS
VENOMS**

IPEN - Doc - 3025

Aprovado para publicação em 10/03/88.

Nota: A redação, ortografia conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM TOXINA ISOLADA NO VENENO DE Crotalus durissus
terrificus

Jayme Nunes de Souza Filho & José Roberto Rogero

RESUMO

É sabido que a radiação ionizante possui a capacidade de alterar, dependendo da dose e condições de radiação, significativamente o comportamento biológico e antigênico de uma toxina, provavelmente por alterações estruturais causadas pela radiação. Neste trabalho, a crotoxina, principal neurotoxina do veneno de cascavel sul-americana, foi isolada utilizando cromatografia por exclusão molecular em gel Sephadex G-75, seguido de precipitação em seu ponto isoelétrico. Após, frações na concentração de 2 mg toxina/ml NaCl 0,85% foram irradiadas em uma fonte de radiação gama ^{60}Co sob taxa de dose de 1100 Gy/hr em doses respectivas de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 Gy. Partindo dessas amostras, foram determinados o conteúdo protéico (método de Lowry), o comportamento antigênico frente ao soro anti-crotálico pela reação de imunodifusão em agar (método de Ouchterlony), a DL50 em camundongos e finalmente, realizado uma eletroforese (SDS-PAGE). Os resultados mostraram que o comportamento antigênico aparentou manter-se intacto até a dose de 1000 Gy, enquanto que a DL50 aumentou em torno de duas vezes para a mesma dose de radiação, quando comparada com a amostra nativa de crotoxina. Com o aumento da dose, as soluções tornaram-se turvas, indicando a presença de agregados e conseqüentemente, perda de proteína em solução, como pode ser visto na determinação do conteúdo protéico e na eletroforese. Outras importantes alterações foram observadas, as quais podem nos dar informações relevantes sobre o evento dose-efeito.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON ISOLATED TOXIN OF Crotalus durissus terrificus VENOM

ABSTRACT

It is known that the ionizing radiation is able to change significantly the biological and antigenic behaviour of a toxin depending of the dose and

radiation's conditions, probably by structural alterations caused by radiation. In this paper, the crotoxin, principal neurotoxin of the south american rattlesnake venom, was isolated using molecular exclusion chromatography with Sephadex G-75 and followed by precipitation on the isoelectric point. (pI 4.7.). Fractions in the concentration of 2 mg toxin/ml 0.85 % NaCl were irradiated in a source of ^{60}Co GAMMACELL with dose rate of 1100 Gy/hr using doses of 250, 500, 1000, 1500 and 2000 Gy. It was determined for this samples, the proteic concentration (Lowry's method), the antigenic capability using crotalic antiserum by the diffusion immunoassay (Ouchterlony's method), the DL50 in mice and eletrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that the antigenic capability seems to be intact until dose of 1000 Gy. By the other hand, the LD50 in the same radiation dose increases more than two times when compared with the native sample. As the radiation dose increases, the solutions became turbid showing loss of protein probably by the presence of aggregates as can be see by the determination of the proteic concentration and the eletrophoretic control. Other important changes were observed with the irradiated samples in comparison with the native crotoxin that can give us additional informations about dose-effect event.

INTRODUÇÃO

A radiação ionizante pode, dependendo da dose e taxa de dose, alterar a conformação de uma toxina e por consequência, seu comportamento biológico, antigênico e imunogênico.

Os efeitos da radiação ionizante em macromoléculas são incrementados quando o fenômeno ocorre em solução aquosa, prevalecendo os efeitos indiretos, onde a radiação promove a formação de radicais livres como por exemplo o OH^\cdot , H^\cdot , e aq.^- e compostos altamente reativos como H_2O_2 , pelo processo nomeado de radiólise da água. Por sua vez, esses componentes possuem a capacidade de atacar determinados grupos da proteína, provocando danos (1).

Aqui, a crotoxina, principal neurotoxina presente no veneno de cascavel sul-americana, foi isolada por cromatografia por exclusão molecular seguida de precipitação em seu ponto isoelétrico (pI 4,7) e irradiada em solução aquosa, sob várias doses de radiação gama ^{60}Co .

A crotoxina, isolada e cristalizada primeiramente por Slotta e Fraenkel-Conrat (14) em 1938, apresenta-se como uma proteína heterodimérica

com propriedade neurotóxica, composta de duas sub-unidades ligadas reversivelmente por ligação não covalente. Quando olhadas separadamente, uma das sub-unidades possui característica básica e atividade fosfolipásica e a outra, altamente ácida e desprovida de atividade biológica e enzimática, sendo esta última nomeada de crotapotin (4,13). Por sua vez, quando as sub-unidades são aliadas, o complexo toma uma alta atividade neurotóxica, não observada nas sub-unidades quando isoladas. Essa interação provoca o aparecimento de uma toxicidade cerca de 10 vezes maior quando comparada com a fosfolipase A (sub-unidade básica) isolada (9), a qual possui uma alta e indireta atividade hemolítica, evidenciando um possível mascaramento da atividade enzimática da fosfolipase A pela crotapotin, a qual promove uma maior especificidade ao complexo (5,6). Alguns trabalhos também sugerem possíveis alterações estruturais no complexo crotoxina quando da associação das sub-unidades, provavelmente favorecendo seu comportamento biológico (3,12).

Como é sabido, a estrutura de uma proteína possui todas as informações que ditam sua atividade biológica, assim como o seu comportamento antigênico e imunogênico. Neste trabalho, a preocupação reside no fato de observarmos as alterações trazidas pela crotoxina em sua atividade biológica e antigênica, após irradiação gama, em solução aquosa. Para tanto, determinou-se o conteúdo protéico, o comportamento antigênico frente ao soro-crotálico, a dose letal 50% em camundongos e ainda realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando as amostras irradiadas e aquela nativa de crotoxina.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Obtenção e purificação da proteína

1.1 - Cromatografia do veneno de C.d. terrificus

Cerca de 300 mg do veneno total foram submetidas a uma cromatografia por exclusão molecular em uma coluna de 80 cm x 2,5 cm de diâmetro, empacotada com gel Sephadex G-75 "fine" e eluída em ácido acético 0,1 M. As frações coletadas foram lidas espectrofotometricamente em 280 nm e aquelas que continham a crotoxina foram misturadas e liofilizadas. A toxina isolada foi então submetida a recromatografia nos mesmos moldes.

1.2 - Precipitação da crotoxina no ponto isoelétrico (pI 4,7)

Cerca de 30 mg de crotoxina recromatografada foram dissolvidas em 4 ml de água destilada. Em seguida, foram adicionadas algumas gotas de ácido fórmico 1 M até a solução atingir pH 3,0, titulando-a logo após com hidróxido

xido de amônio 0,1 M até encontrar o pI. Tão logo isso ocorreu, a solução foi submetida a centrifugação refrigerada a 15000 rpm/15 min. Após a separação do sobrenadante, o precipitado foi resuspendido em tampão formiato 0,1 M pH 3,0. A amostra foi então liofilizada.

2 - Preparação e irradiação das amostras

Em 20 mg de crotoxina, obtida após a precipitação no pI, foram adicionados 10 ml NaCl 0,85%. Em seguida, foram colocadas algumas gotas de ácido clorídrico 0,1 M até que a solução atingisse o pH 3,6, onde a solubilidade da crotoxina torna-se verídica. Feito isso, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1, alíquotada em 6 tubos de ensaio e irradiadas em uma fonte de radiação gama ^{60}Co , sob taxa de dose de 1100 Gy/hr em doses de radiação respectivas de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 Gy, mantendo uma alíquota como amostra nativa.

3 - Determinação do conteúdo protéico

Seguindo o método descrito por Lowry, O.H. (7) modificado por Miller, C.L. (8), foram dosados o conteúdo protéico das amostras, usando o soro-albumina bovina como padrão de dosagem.

Os resultados encontram-se na Tabela I

4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras irradiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo de C. d. terrificus foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em placa (SDS-PAGE), adotando o sistema descontínuo. Aqui, as concentrações finais dos tampões foram: tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 para o gel de empilhamento; tampão Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 para o gel de resolução e Tris 0,025 M glicina 0,192 M pH 8,3 para o tampão de corrida.

A preparação das amostras incluiu uma solução com 2% SDS, 2% B-mercaptoetanol em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8. Em 0,1 g uréia foram adicionados 0,1 ml da solução descrita e 0,1 ml da solução de proteína (150 µg/ml NaCl 0,85%). Em 50 µl desta, foram adicionados 10 µl de azul de bromodenoil 0,002%. Finalmente, 50 µl foram aplicados na placa. Após a corrida (160 V), a placa foi tratada com ácido tricloroacético 12% por 24 horas e corada com coomassie brilliant blue R250 0,1%.

A placa foi então fotografada e dispõe-se na Figura 1.

5 - Reação de imunodifusão em agar-agar

As amostras irradiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo de C. d. terrificus foram submetidas a reação de imunodifusão em agar-agar frente ao soro anti-crotálico gentilmente cedido pelo Instituto Butantan (São

Paulo - Brasil), seguindo o método descrito por Ouchterlony, O. (10).

O tempo de difusão das amostras no agar a 2% (1 g agar-agar em 50 ml tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) foi 24 horas. Após, as lâminas foram lavadas e coradas com negro de amido 0,4% (1 g negro de amido; 25 ml ácido acético glacial; água destilada qsp 250 ml).

As figuras 2, 3 e 4 revelam as linhas de identidade das amostras com o soro anti-crotálico.

6 - Determinação da dose letal 50% (DL50)

A toxicidade das amostras irradiadas e nativa de crotoxina foram determinadas por inoculação intraperitoneal em camundongos Suíços fêmeas, pesando 24 ± 2 g, sob dieta normal.

Foram realizados diluições apropriadas e 0,2 ml da respectiva diluição foi injetada em cada animal, os quais apresentaram-se em grupos de seis / diluição. Os intervalos das diluições usadas foram adequadas para cada amostra, como segue: 72,09 a 300 ug/kg para as amostras de crotoxina nativa e aquela irradiada com dose de 250 Gy; 120,15 a 500 ug/kg para aquela irradiada com 500 Gy; 192,23 a 800 ug/kg para aquela com 1000 Gy; 131,69 a 1000 ug/kg para aquela com 1500 Gy. O fator de diluição usado foi 1 : 1,33, excetuando a amostra irradiada com 1500 Gy, onde aplicou-se um fator de 1:1,5. As concentrações aqui dadas foram aferidas pelos encontros de conteúdo protéico (método de Lowry).

As mortes e sobrevividas foram anotadas após um período de 24 horas e as determinações das DL50 foram calculadas baseando-se no método descrito por Reed, L.J. e Muench, H. (11).

Os resultados dispõem-se na Tabela II.

RESULTADOS

1- Determinação do conteúdo protéico

O ensaio foi realizado em cinco réplicas para cada ponto do padrão e amostras. As concentrações finais, a média das concentrações e as concentrações relativas dispõem-se na Tabela a seguir:

Amostra de Crotoxina	Concentração (ug/ml NaCl 0,85%)			Concentração média			Concentração relativa (%)
Nativa	2425	2527	2578	2425	2476	2486	100
250 Gy	2527	2681	2732	2578	2732	2650	107
500 Gy	2784	2784	2681	2681	2732	2732	110
1000 Gy	2066	2271	2117	2117	2014	2117	85
1500 Gy	1296	1553	1604	1502	1348	1461	59
2000 Gy	866	968	866	814	835	870	35

Tabela I

2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em placa (SDS-PAGE)

A seta nos indica a direção de corrida das amostras aplicadas no gel de empilhamento. A figura 1 apresenta apenas o gel de resolução.



Figura 1

1: veneno total nativo de *C. d. terrificus*; 2: crotoxina nativa;
 3: crotoxina irradiada com 250 Gy; 4: com 500 Gy; 5: com 1000 Gy;
 6: com 1500 Gy; 7: com 2000 Gy.

3 - Reação de imunodifusão em agar-agar

As figuras 2, 3 e 4 revelam as linhas de identidade formadas pelo complexo antígeno-anticorpo, apresentando o antígeno nativo e aqueles irradiados.

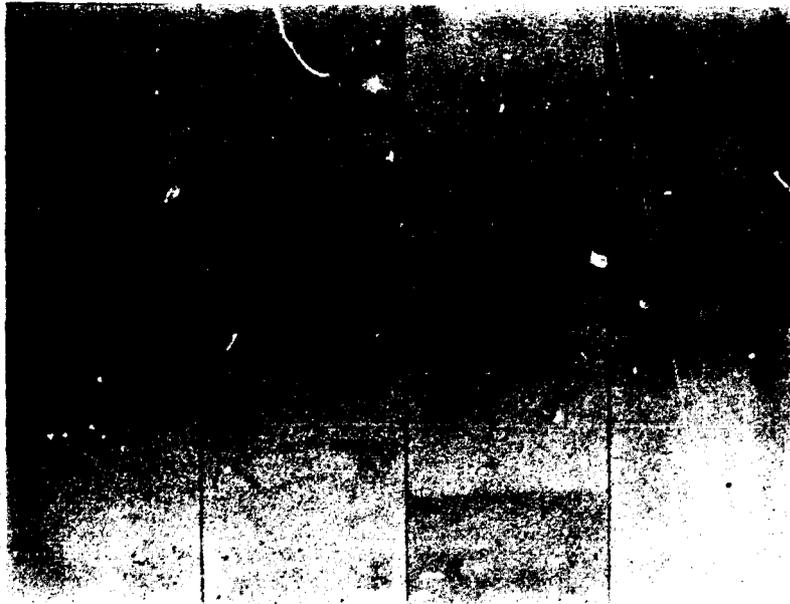


Figura 2



Figura 3



Figura 4

1: soro anti-crotálico; 2: veneno total nativo de *C. d. terrificus*;
 3: crotoxina nativa; 4: crotoxina irradiada com 250 Gy;
 5: com 500 Gy; 6: com 100 Gy; 7: com 1500 Gy, 8: com 2000 Gy.

4 - Determinação da dose letal 50% (DL50)

A tabela abaixo nos mostra as determinações das DL50 indicadas em μg toxina/Kg do animal, para as várias amostras.

Amostra de crotoxina	DL50 ip (ug/kg)
Nativa	147
250 Gy	193
500 Gy	203
1000 Gy	309
1500 Gy	523

Tabela II

A DL50 da amostra de crotoxina irradiada com 2000 Gy não pôde ser detectada devido ao grande índice de precipitação, resultando em pouco material protéico em solução, como pôde ser visto na determinação do conteúdo

protéico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O isolamento da crotoxina oriunda do veneno total de C. d. terrificus foi obtido por cromatografia por exclusão molecular em gel Sephadex G - 75, seguido de precipitação em seu ponto isoelétrico. Após a purificação, a crotoxina foi submetida a radiação gamma ^{60}Co em várias doses, em solução aquosa.

A determinação de conteúdo protéico pelo método de Lowry, O.H. (7) modificado por Miller, G.L. (8), superestimou a concentração de crotoxina nativa em 25% aproximadamente, vindo ao encontro dos achados de Darke, P. et alli (2) onde nos diz que a fosfolipase A2 vinda do veneno de Naja naja, naja quando estimada por esse método e usado o soroalbumina bovina como padrão de dosagem, revela uma concentração maior que a real, necessitando de um fator de correção. Esse achado talvez possa explicar a superestimativa da concentração da crotoxina, lembrando que o complexo possui uma sub-unidade fosfolipásica. É oportuno salientar que a avaliação dos resultados apresenta-se na forma comparativa.

Ainda referindo-se ao conteúdo protéico, deve ser notado que a amostra irradiada com dose de 1000 Gy apresentou uma concentração relativa da ordem de 85%, enquanto que aquela irradiada com 1500 Gy acusou 59% e aquela irradiada com 2000 Gy apontou apenas 35% de conteúdo em solução, quando comparadas com a amostra nativa. Esses dados nos permite enfatizar que a perda de proteínas por agregação e precipitação se torna significativa à medida que aumenta a dose de radiação. As amostras irradiadas com 250 e 500 Gy apresentam-se não diferer-tes significativamente, quando comparadas com a nativa.

Por sua vez, a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em placa (SDS-PAGE) realizada com as amostras irradiadas e nativa de crotoxina e veneno total nativo, nos mostra a presença de zonas difusas que aumentam de intensidade à medida que a dose de radiação aumenta, e também, "regiões de preferência" podem ser notadas, sugerindo a formação de rearranjos protéicos por ligações intermoleculares.

A reação de imunodifusão em agar mostrada nas figuras 2, 3 e 4 nos revelam o grau de antigenicidade das amostras nativas de crotoxina e veneno total e aquelas irradiadas, quando por observação das linhas de precipitação que representam a identidade do complemento antígeno-anticorpo. O com -

portamento antigênico das amostras irradiadas até a dose de irradiação de 1000 Gy aparentam terem sido não afetados pela radiação, mostrando linhas de identidade condizentes com a nativa. Por outro lado, aquelas irradiadas com doses de 1500 e 2000 Gy apresentam-se bastante alteradas, indicando até o aparecimento de uma segunda linha de identidade, provavelmente responsabilizando um antígeno de peso molecular pouco menor que a crotoxina. Esse importante fato nos faz sugerir que a radiação tenha sido suficiente para provocar a dissociação das duas sub-unidades que compõem o complexo crotoxina, mas não o bastante para destruir os determinantes antigênicos de uma delas, provavelmente a fosfolipase A, ocorrendo então a complementação antígeno-anticorpo. É importante salientar que tal linha de precipitação possui considerada identidade com uma das que compõem as frações imunogênicas e antigênicas do veneno total, favorecendo a hipótese que a fosfolipase A ocorre também livre no veneno, além de complexada com a crotapotin.

A determinação da dose letal 50% (DL50) em camundongo nos faz ver uma gradativa detoxificação parcial da toxina com o aumento da dose de radiação. É fato importante notar que a amostra de crotoxina irradiada com dose de 1000 Gy apresentou uma diminuição de toxicidade da ordem de 2 vezes e aquela irradiada com 1500 Gy, 3,5 vezes, sugerindo a ocorrência de um comprometimento da "região neurotóxica" da proteína, provocado pela radiação. As amostras irradiadas com doses de 250 e 500 Gy apresentaram-se detoxificadas em 1,3 e 1,4 vezes respectivamente, quando comparadas com a nativa (FL50 ip 147 ug/kg).

Um perfil comparativo do comportamento biológico e antigênico deve ser traçado, enfatizando que a antigenicidade da crotoxina aparentou estar intacta até a dose de 1000 Gy, enquanto que sua toxicidade diminuiu cerca de 2 vezes, sugerindo que as regiões onde estão localizados os determinantes antigênicos diferem daquela onde está situado o sítio neurotóxico. Esse fato imbui uma importância extrema na tentativa de detoxificação de veneno crotálico por radiação, para fins de produção de soro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24: 273 - 82, 1984.
02. DARKE, P.L.; JARVIN, A.A.; DEEMS, R.A.; DENNIS, E.A. Further character-

- rization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta, 626: 154 - 61, 1980.
03. HANLEY, M.R. Conformation of the neurotoxic crotoxin complex and its subunits. Biochemistry, 18: 1681 - 8, 1979.
 04. HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. Proc. Natl. Acad. Sciences, USA, 68: 1560 - 3, 1971.
 05. HENDON, R.A. & TU, A.T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake. Neurotoxic action. Biochim. Biophys. Acta, 578: 243 - 52, 1979.
 06. JENG, T.W.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 600 - 4, 1978.
 07. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265 - 75, 1951.
 08. MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Analyt. Chem., 31: 964, 1959.
 09. 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.
 10. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5: 1 - 78, 1958.
 11. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hygiene, 27: 493 - 7, 1937.
 12. ROGERO, J.R. Toxicidade 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) (IEA - DT-119).

13. RUSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; BABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 279: 274 - 88, 1971.

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